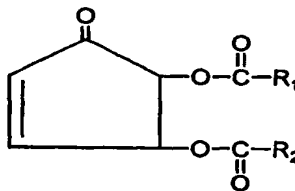




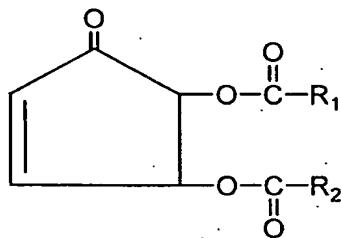
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/215, 31/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/10560</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)</p>		
<table border="0"> <tr> <td data-bbox="121 451 787 1077"> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04323</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月10日(10.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/231659 1998年8月18日(18.08.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)(JP/JP) 〒520-2153 滋賀県大津市一里山6丁目18-19 Shiga, (JP) 大野木宏(OHNOGI, Hiromu)(JP/JP) 〒617-0002 京都府向日市寺戸町渋川16 寶酒造社宅A-406号 Kyoto, (JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津503号 Shiga, (JP) 富永隆生(TOMINAGA, Takanari)(JP/JP) 〒520-0242 滋賀県大津市本堅田4-22-2-204 Shiga, (JP) 西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP) 〒524-0102 滋賀県守山市水保町1411-7 Shiga, (JP)</p> </td> <td data-bbox="787 451 1469 1077"> <p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 〒611-0042 京都府宇治市小倉町久保96 Kyoto, (JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 〒520-3332 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘本町9-421-45 Shiga, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04323</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月10日(10.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/231659 1998年8月18日(18.08.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)(JP/JP) 〒520-2153 滋賀県大津市一里山6丁目18-19 Shiga, (JP) 大野木宏(OHNOGI, Hiromu)(JP/JP) 〒617-0002 京都府向日市寺戸町渋川16 寶酒造社宅A-406号 Kyoto, (JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津503号 Shiga, (JP) 富永隆生(TOMINAGA, Takanari)(JP/JP) 〒520-0242 滋賀県大津市本堅田4-22-2-204 Shiga, (JP) 西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP) 〒524-0102 滋賀県守山市水保町1411-7 Shiga, (JP)</p>	<p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 〒611-0042 京都府宇治市小倉町久保96 Kyoto, (JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 〒520-3332 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘本町9-421-45 Shiga, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04323</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月10日(10.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/231659 1998年8月18日(18.08.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)(JP/JP) 〒520-2153 滋賀県大津市一里山6丁目18-19 Shiga, (JP) 大野木宏(OHNOGI, Hiromu)(JP/JP) 〒617-0002 京都府向日市寺戸町渋川16 寶酒造社宅A-406号 Kyoto, (JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津503号 Shiga, (JP) 富永隆生(TOMINAGA, Takanari)(JP/JP) 〒520-0242 滋賀県大津市本堅田4-22-2-204 Shiga, (JP) 西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP) 〒524-0102 滋賀県守山市水保町1411-7 Shiga, (JP)</p>	<p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 〒611-0042 京都府宇治市小倉町久保96 Kyoto, (JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 〒520-3332 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘本町9-421-45 Shiga, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54)Title: REMEDIES OR PREVENTIVES CONTAINING CYCLOPENTENONE COMPOUNDS AS THE ACTIVE INGREDIENT</p> <p>(54)発明の名称 シクロペンテノン化合物を有効成分とする治療剤又は予防剤</p> <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> </div> <p>(57) Abstract Remedies or preventives for diseases with a need for immunoregulation, diseases with a need for inhibition of inflammation, diseases with a need for regulation of tumor necrosis factor production, diseases with a need for regulation of fungal growth, diseases with a need for regulation of cell adhesion or diseases with a need for induction of heat-shock protein, which contain as the active ingredient at least one compound selected from among cyclopentenone derivatives represented by general formula [I], optically active isomers and salts thereof, wherein R₁ and R₂ are the same or different and each represents hydrogen, an aliphatic group, an aromatic group or an aromatic aliphatic group.</p>				

(57)要約

一般式〔I〕：



〔I〕

(式中、 R_1 及び R_2 は、同一又は異なつて、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を意味する。)で表わされるシクロペンテノン誘導体若しくは光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する免疫調節を必要とする疾患、炎症抑制を必要とする疾患、腫瘍壊死因子産生抑制を必要とする疾患、真菌の抑制を要する疾患、細胞接着抑制を要する疾患、又は熱ショックタンパクの誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI セリテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
VU ユーゴスラヴィア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

シクロペンテノン化合物を有効成分とする治療剤又は予防剤

5 発明の分野

本発明はシクロペンテノン類エステルを有効成分とする医薬に関する。

従来の技術

10 従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとはいいいがたい。

これらのうち、天然物由来であるプロスタグランジンの中で、5員環に α 、 β —不飽和カルボニルを有するプロスタグランジンA及びJ類がDNA合成を抑制することにより、安全性の高い制がん剤としての可能性が報告され、それらの各種誘導体が合成されている（特開昭62-96438号公報参照）。
15

発明の目的

本発明の主な目的は、種々の生理作用を有するシクロペンテノン誘導体を開発し、該化合物を有効成分とする医薬を提供することにある。

20 本発明のこの目的及びその他の目的並びに本発明の利点を、添付の図面を参照して以下の説明より明らかにする。

図面の簡単な説明

25 図1は、ジイソブチリルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

図2は、ジメトキシアセチルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

図3は、ジメチルフマリルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

図4は、ジメチルマレイルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

図5は、投与したシクロペンテノン誘導体量と足浮腫増加率の関係を示す図である。

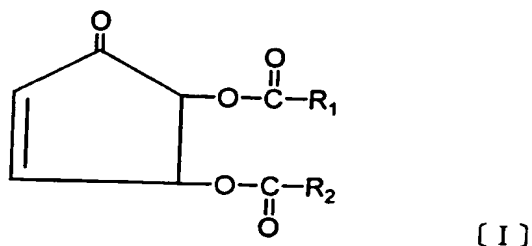
5 図6は、投与したシクロペンテノン誘導体量と遅発型過敏症反応増加率の関係を示す図である。

図7は、ジプロピオニルシクロペンテノン濃度と ^3H -チミジン取り込み量の関係を示す図である。

10 図8は、ジプロピオニルシクロペンテノン濃度と ^3H -チミジン取り込み量の関係を示す図である。

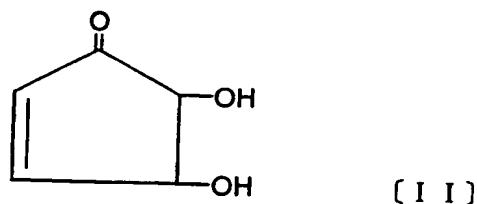
発明の概要

本発明者らはかかる目的を達成するために鋭意検討した結果、式〔I〕：



15 (式中、 R_1 及び R_2 は、同一または異なってもよく、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を意味する。)

で表わされるシクロペンテノン誘導体が、式〔II〕：



20 で表わされる4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペンテノンと称す）と、カルボン酸及び／又はその反応性誘導体との反応により生成し、このシクロペンテノン誘導体が強い免疫調節作用、抗炎症作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、抗真菌作用、細胞接着抑制作用等の生理活性を有す

ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、上記式〔I〕で表されるシクロペンテノン誘導体若しくは光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする免疫調節を必要とする疾患、炎症抑制を必要とする疾患、腫瘍壊死因子産生抑制を必要とする疾患、真菌の抑制を要する疾患、細胞接着抑制を要する疾患、又は熱ショックタンパクの誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤を提供するものである。

発明の詳細な説明

本発明において使用するシクロペンテノンは、4位と5位のヒドロキシル基の立体配置がシスの異性体とトランスの異性体の双方を包含する。本発明においてはシス体シクロペンテノンを用いてもよいし、トランス体シクロペンテノンを用いてもよいし、シス体シクロペンテノンとトランス体シクロペンテノンの混合物を用いてもよい。また、これらの光学活性体を用いてもよい。

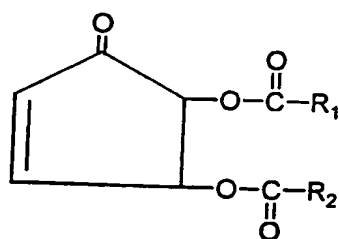
シス体シクロペンテノンは化学合成法によって得られる〔ヘルベチカ キミカ アクタ (H e l v e t i c a C h i m i c a A c t a)、第55巻、第2838～2844頁(1972)〕。トランス体シクロペンテノンは化学合成法によっても得られるし〔カーボハイドレート リサーチ (C a r b o h y d r a t e R e s.)、第247巻、第217～222頁(1993)〕、また、ウロン酸、例えば、グルクロン酸、ウロン酸誘導体、例えば、グルクロノラクトン等を加熱処理することによっても得られる(WO98/13328号公報参照)。本発明では、シクロペンテノンを含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物も使用できる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121℃で4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱処理物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物

中のシクロペンテノンが単離される。

単離されたシクロペンテノンを光学分割することにより、光学活性体として
 (−) − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテン − 1 − オン及び (+) − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテン − 1 − オンを得ることができる。当然、
 5 合成方法により得られたシクロペンテノンも光学分割することができる。

シクロペンテノン及び／又はその光学活性体と、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するカルボン酸及び／又はその反応性誘導体とを、同時又は順次反応させることにより、反応液中に本発明の式〔I〕：



〔I〕

10 で表わされるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体が生成する。

本発明において使用する、上記式〔I〕で表されるシクロペンテノン誘導体の R_1 、 R_2 に相当する、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を有するカルボン酸又はその反応性誘導体は次の通りである。

水素を有するカルボン酸としては、ギ酸を使用できる。

15 脂肪族基を有するカルボン酸としては、アルキル基を有するカルボン酸、アルケニル基を有するカルボン酸を使用することができる。

アルキル基を有するカルボン酸としては、直鎖又は分枝のアルキル基を有するカルボン酸が使用でき、アルキル鎖の鎖長はシクロペンテノン誘導体の生物活性、溶解性等より適宜選択することができるが、通常、C 1 ~ 30 の基が好ましい。

20 直鎖アルキル基を有するカルボン酸としては、例えば、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ヘキサン酸、ヘプタン酸、 n − オクタン酸、ペラルゴン酸、 n − デカン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、イコサン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、セロチン酸、メリシン酸等が使用できる。

25 分枝アルキル基を有するカルボン酸としては、例えば、イソ酪酸、イソ吉草酸、

2-メチル酪酸、ピバル酸、4-メチル吉草酸、1,2-ジメチル吉草酸等が使用できる。

5 アルケニル基を有するカルボン酸としては、直鎖又は分枝のアルケニル基を有するカルボン酸が使用でき、アルケニル基の鎖長、不飽和度、不飽和結合の位置はシクロペンテノン誘導体の生物活性、溶解性等より適宜選択することができるが、通常、C2～30の基が好ましい。

10 直鎖アルケニル基を有するカルボン酸としては、例えば、アクリル酸、ビニル酢酸、クロトン酸、イソクロトン酸、アリル酢酸、2-ヘキセン酸、3-ヘキセン酸、3-オクテン酸、オブツシル酸、10-ウンデセン酸、パルミトレイン酸、ペトロセリン酸、エライジン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、エレオステアリン酸、イコサトリエン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ブラシジン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸、キシメン酸、21-トリアコンテン酸等が使用できる。

15 分枝アルケニル基を有するカルボン酸としては、例えば、メタクリル酸、チグリン酸、アングリカ酸、 α -エチルクロトン酸等が使用できる。

20 置換基を有する脂肪族基を有するカルボン酸としては、C1～4の低級アルコキシ基を置換基として有するアルキル基を有するカルボン酸、例えば、メトキシ酢酸を使用することができる。また、C2～5の低級アルコキシカルボニルを置換基として有するアルケニル基を有するカルボン酸、例えば、メチルマレイン酸を使用することができる。

25 芳香族基を有するカルボン酸としては、例えば、安息香酸、トルイル酸、クロロ安息香酸、ブロモ安息香酸、ニトロ安息香酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、サリチル酸、アセチルサリチル酸、アセチルサリチルサリチル酸、アミノサリチル酸、p-ヒドロキシ安息香酸、アミノ安息香酸、メトキシ安息香酸、アセトアミド安息香酸、バニリン酸、オルセリン酸、ナフトエ酸、シンコメロン酸、キサツレン酸、キニン酸、キヌレン酸等が使用できるが、生成するシクロペンテノン誘導体の生物活性、溶解性等より使用する芳香族基を有するカルボン酸を選択すればよい。

芳香脂肪族基を有するカルボン酸としては、例えば、フェニル酢酸、フェニル

プロピオン酸、フェニル乳酸、フェニルピルビン酸、ケイ皮酸、アトロパ酸、ナフチル酢酸等が使用できるが、生成するシクロペンテノン誘導体の生物活性、溶解性等より、使用する芳香脂肪族基を有するカルボン酸を選択すればよい。

5 脂肪族基、芳香族基、又は芳香脂肪族基は、置換基、例えば、アミノ基、ニトロ基、オキソ基、水酸基、チオール基、硫酸基等の官能性基やハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）を有していても良い。

10 かくして、式〔I〕における R_1 及び R_2 の例としては、同一又は異なって、水素、C1～30の直鎖又は分枝アルキル基、C2～30の直鎖又は分枝アルケニル基、C6～10のアリール基又はC1～30アルキルC6～10アリール基が挙げられ、これらは所望により、C1～30アルキル基、C1～4アルコキシ基、C2～5アルコキシカルボニル基、アミノ基、ニトロ基、オキソ基、水酸基、チオール基、硫酸基、ハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）から選択される1つ以上の置換基で置換されていてもよい。

15 カルボン酸の反応性誘導体としては、酸ハライド、酸無水物、酸エステル、塩等が例示され、目的に応じ、使用するカルボン酸の反応性誘導体を作製すれば良い。

20 カルボン酸又はその反応性誘導体とシクロペンテノンとの反応はシクロペンテノン誘導体の R_1 、 R_2 が同一になるように行っても良く、 R_1 、 R_2 が異なるように行っても良い。すなわち、 R_1 、 R_2 が異なるカルボン酸を同時にシクロペンテノンと反応させても良く、順次 R_1 、 R_2 が異なるカルボン酸を反応させても良い。このとき、シクロペンテノンの水酸基の片方を保護することにより、効率よく、 R_1 、 R_2 が異なるシクロペンテノン誘導体を作製することができる。

25 シクロペンテノン又はその光学活性体とカルボン酸とが反応し、生成したシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体は免疫調節作用、抗炎症作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、抗真菌作用、細胞接着抑制作用等を有し、この活性を指標にシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体を反応液中から精製、単離することができる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方

法を組合せ、反応生成物中のシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体を精製、単離することができる。

例えば、シクロペンテノン又はその光学活性体、4-ジメチルアミノピリジン、及びカルボン酸をジクロロメタンに溶解し、氷冷下N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを加え反応させることにより、本発明に使用するシクロペンテノン誘導体が生成する。生成物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより精製することにより、目的のシクロペンテノン誘導体を単離することができる。

また、シクロペンテノン又はその光学活性体と無水酢酸とを無水ピリジン中で反応させ、反応物中からジアセチルシクロペンテノンを精製、単離することができる。

本発明により使用されるシクロペンテノン誘導体の光学活性体の分離はラセミ混合物の機械的分割、優先晶出法、ジアステレオマー塩あるいは包接化合物としての結晶化による分割、酵素・微生物による動力学的分割、クロマトグラフィーによる分割等により行うことができる。

クロマトグラフィーによる分割としては、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、それぞれに適したキラル固定相を使用すればよい。

液体クロマトグラフィーによる光学分割としては、キラルな固定相を用いる方法、キラルな溶離液を用いる方法、ジアステレオマーとしての分離等を用いることができる。

キラル固定相としては、アミド系固定相、尿素系固定相、配位子交換型固定相、多糖・多糖誘導体固定相、タンパク質固定相、ポリメタクリル酸エステル固定相、ポリメタクリルアミド固定相等が使用できる。

溶離液としてはヘキサン系、アルコール系、水（緩衝液）系等が使用でき、上記固定相との組合せにおいて適宜使用することができる。

本発明で使用されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

本発明で使用されるシクロペンテノン誘導体の代表的な例としては、ジアセチルシクロペンテノン、ジプロピオニルシクロペンテノン、ジブチリルシクロペン

テノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジバレリルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジオクタノイルシクロペンテノン、ジデカノイルシクロペンテノン、ジミリストイルシクロペンテノン、ジメトキシアセチルシクロペンテノン、ジメチルフマリルシクロペンテノン、ジメチルマレイルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジ-3-オクテノイルシクロペンテノン、ジベンゾイルシクロペンテノンなどが挙げられる。

本発明で使用されるシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、免疫調節作用、例えば、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、ナチュラルキラー細胞活性化作用、がん細胞特異的リンパ球活性化作用、抗炎症作用、例えば、カラゲナン浮腫抑制作用、遅発型過敏症反応抑制作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、トポイソメラーゼ阻害作用、熱ショックタンパク誘導作用、細胞接着抑制作用、抗真菌作用等を有し、免疫調節が必要な疾病、炎症抑制が必要な疾病、腫瘍壊死因子産生抑制が必要な疾病、トポイソメラーゼ阻害を要する疾病、熱ショックタンパク誘導を要する疾病、真菌の増殖抑制を要する疾病、細胞接着の抑制を要する疾病等の治療剤又は予防剤として有用であり、シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として免疫調節剤、抗炎症剤、腫瘍壊死因子産生抑制剤、トポイソメラーゼ阻害剤、熱ショックタンパク誘導剤、抗真菌剤、細胞接着抑制剤を製造することができる。

腫瘍壊死因子は、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として発見されたが、現在では炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広くかかわるサイトカインとして認識されている。この腫瘍壊死因子の産生調節機構の破綻は様々な不都合を宿主にもたらし、腫瘍壊死因子の過度又は未調節の産生は、慢性関節性リウマチ、リウマチ性脊髄炎、変形性関節症、痛風性関節炎、敗血症、敗血性ショック、内毒素ショック、グラム陰性菌敗血症、毒性ショック症候群、脳性マラリア、慢性肺炎、移植片対宿主反応、同種移植片拒絶反応、インフルエンザのような感染症による発熱及び筋肉痛、感染又は悪性腫瘍に対して二次的な悪液質、ヒト後天性免疫不全症候群（AIDS）に対して二次的な悪液質、AIDS、AIDS関連症候群、ケロイド形成、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、自己免疫糖尿病及び全身

エリテマトーデス等の自己免疫疾患を含む、これらの多くの疾患に関連している
〔モレキュラー メディシン (Molecular Medicine) 、第33巻、第1010～
1020頁、第1182～1189頁(1996)〕。本発明の腫瘍壊死因子産
生抑制剤は、腫瘍壊死因子により媒介されるか又は悪化する病状の治療、予防、
5 例えば腫瘍壊死因子が原因となるインスリン非依存型糖尿病〔ネーチャー
(Nature) 、第389巻、第610～614頁(1997)〕の治療、予防に有
用である。

また、本発明により、シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそ
れらの塩から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として使用する腫瘍
10 壊死因子の産生の調節方法が提供される。また本発明により、シクロペンテノン
誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1つの
化合物を含有し、腫瘍壊死因子により媒介されるか又は悪化する疾病の病状の改
善用食品又は飲料、又は疾病予防用食品又は飲料が提供される。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はリンパ球幼
15 若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用等の免疫調節作用を有し、これら
の化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分とする免疫調節剤は
これらの免疫系、免疫因子の異常が起因となる疾病、免疫賦活を要する疾病の治
療剤又は予防剤として有用である。

すなわち、リンパ球幼若化反応とは、マイトジェンがリンパ球表面の受容体に
20 結合し、リンパ球を活性化させ、その分裂、増殖を促す反応である。混合リンパ
球反応とは、同種異系の動物より得られたリンパ球を混合培養することにより、
主要組織適合抗原の不一致によるリンパ球の活性化が誘導され、リンパ球の分裂、
増殖が促進される反応である。上記免疫調節剤はこれらの反応を抑制し、リンパ
球の異常亢進が起因となる自己免疫性疾患、例えば慢性腎炎、慢性大腸炎、I型
25 糖尿病、慢性関節リウマチ等の慢性の疾患の治療又は予防に特に有用であり、ま
た移植片拒絶反応の抑制においても有用である。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はカラゲナン
足浮腫抑制作用を示し、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物
を有効成分として含有する抗炎症剤は、炎症抑制を必要とする疾病の治療剤又は

予防剤として有用である。

カラゲナン足浮腫モデルは、起炎剤であるカラゲナンを足蹠部に皮下注射することにより、マクロファージ、好中球等の炎症細胞が誘導され、これらの細胞から産生された炎症性の因子により血管透過性が亢進し、浮腫が惹起される反応である。上記抗炎症剤の浮腫抑制作用は、血管透過性の亢進の制御を必要とする疾患、例えば慢性関節リウマチの治療又は予防に有用である。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、遅発型過敏症反応抑制作用を示し、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する抗炎症剤は、感染症などによって引き起こされる遅発型過敏症反応抑制を必要とする疾病の治療剤又は予防剤として有用である。

遅発型過敏症反応は、活性化されたリンパ球、単球、マクロファージなどによる細胞性免疫に依存した炎症反応である。炎症部位に浸潤したこれらの細胞から産生されたサイトカインにより血管透過性が亢進し、浮腫、肉芽腫、線維化、壊死が起こり、重篤な障害が引き起こされる。遅発型過敏症反応によるアレルギー性皮膚炎は接触性皮膚炎の多数を占め、更に細菌、ウイルス又は薬物が抗原となるアレルギーにおいても、その発症の原因となっている。ヒツジ赤血球を抗原として用いたマウスのモデルは遅発型過敏症反応の試験としてよく用いられており、本モデルにおいて有効性を示す化合物は上記のアレルギー性疾患の治療又は予防に有用であると考えられる。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、正常細胞では分裂期のみに一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼIIに特異的に阻害活性を示し、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するトポイソメラーゼ阻害剤は制がん剤として使用することもできる。また、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として使用するトポイソメラーゼ阻害方法は生化学研究や制がん剤のスクリーニング等に有用である。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は細胞接着抑制活性を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する細胞接着抑制剤を提供することができる。本発明の細胞接着抑

制剤は細胞接着の抑制を要する疾病の治療剤又は予防剤として有用である。

例えば、がん転移は原発巣で増殖したがん細胞が血管内へ遊離し、転移部位まで移動して組織内浸潤することにより成立する。このうち血管内から転移部位への移動においてがん細胞と血管内皮細胞との接着が必要となる。がん転移に關与する接着分子として血管内皮細胞側の ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1 等が知られており、それぞれに対応するがん細胞側のリガンドは LFA-1、VLA-4、シアリルルイス X であることが同定されている。白血病細胞にはこれらの接着分子がしばしば発現されており、白血病細胞の血管外浸潤に關与していると考えられている。したがって、本発明の細胞接着抑制剤は、これら接着分子を介したがん細胞の接着を抑制することによりがん転移の抑制が期待される。

また、シクロペンテノン、シクロペンテノンと SH 基含有化合物より生成される PCT/JP98/00815 号明細書記載の化合物もそれぞれ細胞接着抑制活性を示し、これらの化合物から選択される少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する細胞接着抑制剤を提供することができる。

本発明により提供される細胞接着抑制剤は、細胞接着抑制方法に使用することができ、該方法は細胞接着に関する生化学的研究や、細胞接着阻害剤や細胞接着活性剤のスクリーニングに有用である。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はナチュラルキラー (NK) 細胞活性化作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する NK 細胞活性化剤を提供することができる。本発明の NK 細胞活性化剤は NK 細胞の活性化を要する疾病の治療剤又は予防剤として有用である。

すなわち、NK 細胞は細菌、ウイルス感染細胞やがん細胞を認識し、細胞膜傷害作用によりこれらを排除する細胞である。従って、NK 細胞を活性化させることは生体の免疫防御機構を高めることであり、本発明の NK 細胞活性化剤は細菌、ウイルス疾患やがん治療または予防に有用である。

また、シクロペンテノン、シクロペンテノンと SH 基含有化合物より生成される PCT/JP98/00815 号明細書記載の化合物もそれぞれ NK 細胞活性化作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも 1 つの化合物を有効成

分として含有するNK細胞活性化剤を提供することができる。

本発明により提供されるNK細胞活性化剤は、NK細胞活性化方法に使用することができ、該方法は免疫防御機構に関する生化学的研究や、免疫防御剤のスクリーニングに有用である。

5 シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗真菌作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗真菌剤を製造することができる。

従来、真菌感染症の治療剤としては、アンホテリシンB、フルシトシン、ミコナゾール、フルコナゾールのほか多数あるが、効力及び毒性若しくは耐性菌の点
10 で問題がある。特に近年増加傾向にある全身感染に有効な低毒性の薬剤は少ない。本発明の抗真菌剤は毒性も少なく、新しいタイプの抗真菌剤として有用である。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は熱ショックタンパク誘導作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分とする熱ショックタンパク誘導剤を製造することができ、熱ショックタンパク誘導を必要とする疾患に応じた方法で投与することができる。
15

すなわち、シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は70kダルトン(HSP70)等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を
20 有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、これらの化合物はがん免疫にも有効である。更に抗炎症等生体防御作用をも有する。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、インフルエンザウイルスによる風邪疾患等のウイルス性疾患が予防、治療できる。

なお、熱ショックタンパクは細胞や個体が平常の温度よりも5～10℃程度高い温度変化を急激に受けたときに合成が誘導されるタンパクの総称であり、原核生物から高等真核生物まで幅広く分布している。真核生物の熱ショックタンパクとしてはHSP90、HSP70、ユビキチン、HSP26等が知られている。
25 その中でHSP70は分子シャペロンの一種であり、フォールディングが完了していない、または不完全にフォールディングしたタンパクに結合して立体構造の

形成を助ける。熱ショックタンパクのアミノ酸配列は進化の過程でよく保存されており、HSP70は大腸菌のDnaKタンパクと相同である。ヒトには約10個のHSP70遺伝子が存在しているが、これらのあるものは構成的に発現しており、あるものは様々な刺激によって誘導される。熱ショックタンパクの合成は熱ショックのほかに様々な化学物質、酸化ストレス等の細胞障害によっても誘導される。

C. アミチ (C. Amici) ら [ジャーナル オブ ビロロジ (Journal of Virology)、第68巻、第6890~6899頁 (1994)] は、 α 、 β -不飽和カルボニルを持つプロスタグランジンA₁の存在下でセンダイウイルスを感染させた動物細胞を培養するとHSP70とHSP90の合成が誘導され、HSP70の合成が誘導されている間はウイルスタンパクの合成が抑制されることを報告している。また、A. ロッシ (A. Rossi) ら [ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、第271巻、第32192~32196頁 (1996)] は、2-シクロペンテン-1-オンがプロスタグランジンA₁と同様にHSP70の合成を誘導し、水疱性口内炎ウイルスタンパクの合成を抑制することを報告している。

シクロペンテノン誘導体、例えば、ジイソブチルシクロペンテノンによるHSP70誘導能は1.25 μ Mでみられ、2.5 μ Mで最大となるが、これは2-シクロペンテン-1-オンがHSP70を誘導するには数百 μ Mの濃度を要することと比較すると極めて高い誘導能であるといえる。

シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこのように高い熱ショックタンパク誘導作用を持つことから、DNAウイルス、RNAウイルス、レトロウイルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。これらのウイルス、ウイロイドには上記の各ウイルス、ウイロイドが例示される。

本発明の治療剤又は予防剤の製造は、一般的にはシクロペンテノン誘導体、免疫調節剤の製造は、一般的にはシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を有効成分とし、薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉

末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

5 医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

10 一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

15 本発明の免疫調節剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

20 免疫調節剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物の量が成人1日当り0.1 μ g ~ 200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取

25 させることもできる。

本発明の腫瘍壊死因子産生抑制剤、抗炎症剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞接着抑制剤、熱ショックタンパク誘導剤、抗真菌剤は上記免疫調節剤に準じ、製剤化することができ、各疾病に応じた方法で投与することができる。もちろん各薬剤の投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で

十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の各薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

5 本発明で使用するシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はシクロペンテノン及び任意のカルボン酸若しくはその反応性誘導体より、効率よく製造することができる。

10 上記製造法により、シクロペンテノンと無水イソ酪酸の反応生成物であるジイソブチルシクロペンテノン、シクロペンテノンとメトキシ酢酸の反応生成物であるジメトキシアセチルシクロペンテノン、シクロペンテノンとメチルマレイン酸との反応生成物であるジメチルフマリルシクロペンテノン、及びジメチルマレイルシクロペンテノンがそれぞれ提供される。

これらの化合物は制がん活性、トポイソメラーゼ阻害活性等を有し、これらの化合物若しくはそれらの光学活性体又はそれらの塩を有効成分として制がん剤等の医薬とすることができる。

15 本発明で得られたシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分として含有する食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に有効量の生理作用を有するシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物が含有されてい

20 れれば良く、免疫調節用食品又は飲料等の機能性食品又は飲料とすることができる。

25 本発明で得られるシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩はその生理活性の有効量の投与を行っても毒性は認められない。例えば、経口投与の場合、ジプロピオニルシクロペンテノン、ジヘキサノルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジイソブチルシクロペンテノン、ジベンゾイルシクロペンテノン若しくはこれらの光学活性体又はそれらの塩のいずれかを100mg/kgでマウスに単回投与しても死亡例は認められない。

以上、シクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、簡便に製造でき、その種々の生理的機能により、医薬、食品等の広い分野において

極めて有用な化合物である。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

5 実施例 1

(1) 10 g の D-グルクロン酸 (シグマ社製 G 5269) を 1 リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 混合液の上層40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10 ml まで濃縮した。

10 上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (2 × 28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2 kg/cm²に加圧し、毎分5 ml の流速で分離を行った。1 画分当り10 ml になるようにフラクションーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。15 これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100 mg のシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプ S カラムを用いた順相 HPLC で分離し、215 nm の紫外部吸収で検出したところ、純度は98%であった。

20 上記と同様の方法で得たシクロペンテノン113.9 mg をエタノール2.85 ml に溶かした。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール (94/6) 3.85 ml を更に加え、17 mg/ml のシクロペンテノン溶液を調製した。この液を0.5 μm のフィルターでろ過し、光学分割 HPLC 試料溶液とした。

25 この試料溶液を以下の条件で光学分割 HPLC を行い、前ピークの (-) 体シクロペンテノン及び後ピークの (+) 体シクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、(-) 体シクロペンテノン43.2 mg、(+) 体シクロペンテノン43.0 mg をそれぞれ得た。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラルパック AS (ダイセル化学工業) 2.0 cm × 25.0 cm

m

カラム温度：40℃

移動相：ヘキサン／エタノール（94／6）

流速：14.0 ml/min

5 検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μ l（2.55 mg）

得られた（－）体シクロペンテノン及び（＋）体シクロペンテノンは両者共に約1％のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークの（－）体シクロペンテノン30.0 mgから19.7 mgのエナンチオマーを含有しない（－）体シクロペンテノンを、後ピークの（＋）体シクロペンテノン37.4 mgから27.7 mgのエナンチオマーを含有しない（＋）体シクロペンテノンをそれぞれ得た。なお（－）体シクロペンテノン及び（＋）体シクロペンテノンの光学分割HPLCの溶出時間はそれぞれ33分、40分であった。

15 （2）実施例1－（1）記載の方法で得たシクロペンテノン29.6 mgに無水ピリジン（ナカライテスク社製 295－26）1 ml、無水酢酸（ナカライテスク社製 002－26）0.1 mlを加えて室温で3時間かくはんした。反応液をクロロホルムで抽出してジアセチルシクロペンテノン36 mgを得た。

20 得られたジアセチルシクロペンテノンの質量分析をDX302質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、CDCl₃に溶解し、NMRによってその構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A500（日本電子社製）を用いた。その結果を以下に示す。但し、¹H-NMRの化学シフト値はクロロホルムの化学シフト値を7.24 ppmとして表した。

MS m/z 199 (M+H)⁺

25 ¹H-NMR

δ 2.12 (3H, s, -OCOCH₃), 2.16 (3H, s, -OCOC H₃), 5.16 (1H, d, J=3.0 Hz, H-5), 5.89 (1H, m, H-4), 6.40 (1H, d-d, J=1.5, 6.5 Hz, H-2), 7.43 (1H, d-d, J=2.5, 6.5 Hz, H-3)

(3) 実施例 1 - (1) の方法で得た (-) 体シクロペンテノン 15.9 mg を用いて上記実施例 1 - (2) と同様の反応を行い、ジアセチル (-) 体シクロペンテノン 15.1 mg を得た。上記実施例 1 - (2) と同様に質量分析と核磁気共鳴による構造解析を行い、上記実施例 1 - (2) と同様の結果が得られた。

5 (4) 実施例 1 - (1) の方法で得た (+) 体シクロペンテノン 16.7 mg を用いて上記参考例 1 - (2) と同様の反応を行い、ジアセチル (+) 体シクロペンテノン 18.8 mg を得た。上記実施例 1 - (2) と同様に質量分析と核磁気共鳴による構造解析を行い、上記実施例 1 - (2) と同様の結果が得られた。

10 (5) シクロペンテノン 13.8 mg に安息香酸 (ナカライテスク社製 041-20) 44.3 mg、ジメチルアミノピリジン (DMAP: 東京化成工業社製 D1450) 7.5 mg、N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC: ペプチド研究所社製 1001) 51.0 mg を加えてクロロホルム 5 ml を添加し、氷冷中 4 時間かくはんした。反応液をろ過して得られたろ液をシリカゲルカラム (75 ml) にアプライし、クロロホルムで溶出してジベンゾイルシクロペンテノンを含む画分を得た。この画分の溶媒を減圧下除去し、残渣をエタノールに溶解した後、クロロホルムとメタノールの 99:1 混合液を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分離した。Rf = 0.45 ~ 0.55 の部分のシリカゲルを薄層から掻き取り、クロロホルムで抽出することによりジベンゾイルシクロペンテノン 3.2 mg を得た。

20 得られたジベンゾイルシクロペンテノンの質量分析と核磁気共鳴による構造解析を上記実施例 1 - (2) と同様に行った。その結果を以下に示す。

MS m/z 323 (M+H)⁺

¹H-NMR

25 δ 5.56 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-5), 6.30 (1H, m, H-4), 6.54 (1H, d-d, J = 1.5, 6.5 Hz, H-2), 7.44 (4H, m, 芳香環のH), 7.58 (2H, m, 芳香環のH), 7.64 (1H, d-d, J = 2.0, 6.5 Hz, H-3), 8.06 (4H, m, 芳香環のH)

(6) (-) 体シクロペンテノン 22.1 mg、安息香酸 71.9 mg、DM

AP 12.1 mg、DCC 80.3 mgを用いて上記実施例1-(5)と同様の反応を行い、ジベンゾイル(-)体シクロペンテノン19.2 mgを得た。上記実施例1-(5)と同様に質量分析と核磁気共鳴による構造解析を行い、上記実施例1-(5)と同様の結果が得られた。

5 (7) (+)体シクロペンテノン20.4 mg、安息香酸65.6 mg、DMAP 11.0 mg、DCC 74.3 mgを用いて上記実施例1-(5)と同様の反応を行い、ジベンゾイル(+)体シクロペンテノン21.4 mgを得た。上記実施例1-(5)と同様に質量分析と核磁気共鳴による構造解析を行い、上記実施例1-(5)と同様の結果が得られた。

10 (8) シクロペンテノン30 mg、DMAP 10 mg、ヘキサノ酸(ナカライテスク社製 070-26) 153 mgを5.9 mlのジクロロメタンに溶解し、氷冷下DCC 108 mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離精製した。R_f = 0.3~0.4の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより11 mgのジヘキサノイルシクロペンテノンを得た。

15 得られたジヘキサノイルシクロペンテノンをCDCl₃に溶解して核磁気共鳴法(NMR)によって確認した。核磁気共鳴装置はJNM-EX270 FT NMR システム(日本電子社製)を用いた。また、¹H-NMRの化学シフト値はテトラメチルシランの化学シフト値を0 ppmとして表した。

20 その結果を以下に示す。

¹H-NMR

25 δ 7.44 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 1.98 Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 1.32 Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J₄₋₅ = 2.97 Hz, H-5), 2.42 (2H, t, J = 7.26 Hz), 2.38 (2H, t, J = 7.76 Hz), 1.65 (4H, m), 1.26 (8H, m), 0.88 (6H, t)

(9) シクロペンテノン30 mg、DMAP 10 mg、ミリスチン酸(東京化成工業社製 M0476) 301 mgを5.9 mlのジクロロメタンに溶解し、

氷冷下DCC 108mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離した。Rf=0.45~0.55の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより53mgのジミリストイルシクロペンテノンを得た。

- 5 得られたジミリストイルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

10 δ 7.45 (1H, dd, J₂₋₃=5.94 Hz, J₃₋₄=2.31 Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃=5.31 Hz, J₃₋₄=1.32 Hz, H-2), 5.92 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J₄₋₅=2.64 Hz, H-5), 2.42 (2H, t, J=7.26 Hz), 2.38 (2H, t, J=7.91 Hz), 1.63 (4H, m), 1.26 (32H, m), 0.88 (6H, t)

- 15 (10) シクロペンテノン30mg、DMAP 10mg、オクタン酸 (ナカライテスク社製 071-11) 190mgを5.9mlのジクロロメタンに溶解し、氷冷下DCC 108mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離した。Rf=0.25~0.35の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより27mgのジオクタノイルシクロペンテノンを得た。

- 20 得られたジオクタノイルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

25 δ 7.44 (1H, dd, J₂₋₃=6.1 Hz, J₃₋₄=2.16 Hz, H-3), 6.41 (1H, dd, J₂₋₃=6.1 Hz, J₃₋₄=1.48 Hz, H-2), 5.92 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J₄₋₅=2.97 Hz, H-5), 2.42 (2H, t, J=7.59 Hz), 2.38 (2H, t, J=7.91 Hz), 1.65 (4H, m), 1.29 (16H, m), 0.88 (6H, t)

- (11) シクロペンテノン30mg、DMAP 10mg、3-オクテン酸

(東京化成工業社製 00070) 190mgを5.9mlのジクロロメタンに溶解し、氷冷下DCC 108mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離した。Rf = 0.25~0.35の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより25mgのジ-3-オクテノイルシクロペンテノンを得た。

得られたジ-3-オクテノイルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

δ 7.44 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 2.32 Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 1.49 Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.55 (4H, m), 5.16 (1H, d, J₄₋₅ = 2.97 Hz, H-5), 3.12 (4H, dd, J = 12.85 Hz, J = 6.59 Hz), 2.04 (4H, m), 1.33 (8H, m), 0.89 (6H, t)

(12) シクロペンテノン30mg、DMAP 10mg、n-酪酸(東京化成工業社製 B0754) 115mgを5.9mlのジクロロメタンに溶解し、氷冷下DCC 108mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離した。Rf = 0.20~0.30の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより16mgのジブチリルシクロペンテノンを得た。

得られたジブチリルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

δ 7.45 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 2.13 Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃ = 6.27 Hz, J₃₋₄ = 1.65 Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J₄₋₅ = 2.64 Hz, H-5)

(13) シクロペンテノン30mg、DMAP 10mg、n-デカン酸(東京化成工業社製 D0017) 226mgを5.9mlのジクロロメタンに溶解

し、氷冷下DCC 108mgを加えた。1時間反応後、クロロホルムを展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって反応液を分離した。Rf = 0.35~0.45の部分のシリカゲルを薄層から掻き取ってクロロホルムで抽出することにより35mgのジデカノイルシクロペンテノンを得た。

- 5 得られたジデカノイルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

10 δ 7.44 (1H, dd, J₂₋₃=6.27Hz, J₃₋₄=1.97Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃=6.27Hz, J₃₋₄=1.3Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.15 (1H, d, J₄₋₅=2.97Hz, H-5), 2.42 (2H, t, J=7.24Hz), 2.38 (2H, t, J=7.91Hz), 1.65 (4H, m), 1.26 (24H, m), 0.88 (6H, t)

- 15 (14) シクロペンテノン30mg、DMAP 16mg、トリエチルアミン (東京化成工業社製 T0424) 66mg及び無水n-吉草酸 (東京化成工業社製 V0006) 122mgを5.9mlのジクロロメタンに溶解し、氷冷下1時間反応させた。この反応液をクロロホルム：メタノール=200：1を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって展開し、Rf=0.7~0.8の部分のシリカゲルを薄層から掻き取り、クロロホルムで抽出することによって39mgのジバレリルシクロペンテノンを得た。
- 20 得られたジバレリルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(8)と同様に行った。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

25 δ 7.45 (1H, dd, J₂₋₃=6.11Hz, J₃₋₄=1.66Hz, H-3), 6.42 (1H, dd, J₂₋₃=6.11Hz, J₃₋₄=1.66Hz, H-2), 5.91 (1H, m, H-4), 5.16 (1H, d, J₄₋₅=2.97Hz, H-5), 2.43 (2H, dd, J=7.59, 7.59Hz), 2.39 (2H, dd, J=7.59, 7.59Hz), 1.65 (4H, m), 1.38 (4H, m), 0.93 (6H, dd, J=7.26,

7. 26 Hz)

5 (15) シクロペンテノン 30 mg、DMAP 16 mg、トリエチルアミン 66 mg 及び無水プロピオン酸（東京化成工業社製 P0513）86 mg を 5.9 ml のジクロロメタンに溶解し、氷冷下 1 時間反応させた。この反応液をクロロホルム：メタノール=200：1 を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーによって展開し、 $R_f = 0.5 \sim 0.6$ の部分のシリカゲルを薄層から掻き取り、クロロホルムで抽出することによって 31 mg のジプロピオニルシクロペンテノンを得た。

10 得られたジプロピオニルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例 1 - (8) と同様に行った。その結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$

15 δ 7.45 (1H, dd, $J_{2-3} = 6.27 \text{ Hz}$, $J_{3-4} = 2.15 \text{ Hz}$, H-3)、6.42 (1H, dd, $J_{2-3} = 6.27 \text{ Hz}$, $J_{3-4} = 1.49 \text{ Hz}$, H-2)、5.91 (1H, m, H-4)、5.16 (1H, d, $J_{4-5} = 2.97 \text{ Hz}$, H-5)、2.46 (2H, dd, $J = 15.01$, 7.59 Hz)、2.42 (2H, dd, $J = 15.01$, 7.59 Hz)、1.18 (6H, dd, $J = 7.59$, 7.59 Hz)

20 (16) シクロペンテノン 2 g、DMAP 733 mg、trans-2-ヘキセン酸（東京化成工業社製、H0383）4.1 ml 及び DCC 5.57 g を 200 ml のジクロロメタンに溶解し、室温で 2 時間反応させた。この反応液をヘキサン：酢酸エチル=8：1 を溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、シリカゲル薄層クロマトグラフィー上で単一のスポットを示す画分を得た。この画分を減圧下濃縮し、油状のジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン約 900 mg を得た。

25 得られたジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノンの核磁気共鳴による構造解析を実施例 1 - (8) と同様に行った。その結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$

δ 0.92 (6H, m, 11-H + 11'-H)、1.48 (4H, m, 10-H + 10'-H)、2.18 (4H, m, 9-H, 9'-H)、5.22 (1

H, d, $J=3.0\text{ Hz}$, 5-H)、5.85 (2H, m, 7-H+7'-H)、5.98 (1H, m, 4-H)、6.41 (1H, dd, $J=1.0$, 6.0 Hz, 2-H)、7.04 (2H, m, 8-H+8'-H)、7.47 (1H, d, $J=2.0$, 6.0 Hz, 3-H)

5 なお、シクロペンテノンの5位に結合している2-ヘキセノイル基の炭素をカルボニル基から順に6位～11位、シクロペンテノンの4位に結合している2-ヘキセノイル基の炭素をカルボニル基から順に6'位～11'位とした。

10 (17) シクロペンテノン1.2gを200mlのジクロロメタンに溶解し、無水イソ酪酸 (ナカライテスク社製) 1.7ml、DMAP 427mg、トリエチルアミン (ナカライテスク社製) 1.46mlを加えた。室温で1時間反応後減圧下濃縮して酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸及び飽和重曹水溶液で洗浄した。これを減圧下濃縮し、ヘキサン：酢酸エチル=8:1を展開溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、ヘキサン：酢酸エチル=6:1を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーで $R_f=0.2$ のスポットを
15 与える画分を得た。本画分の溶媒を減圧下留去し、高純度のジイソブチリルシクロペンテノンを含む470mgの油状物を得た。

得られたジイソブチリルシクロペンテノンを重クロロホルムに溶解し、核磁気共鳴による構造解析を実施例1-(2)に従い行った。その結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$

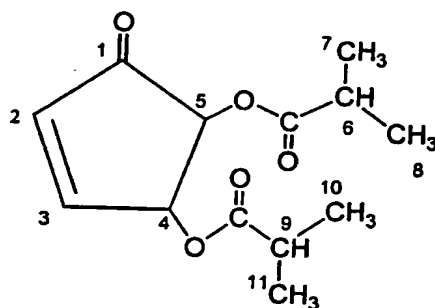
20 δ 1.18 (12H, m, 7-H, 8-H, 10-H, 11-H)、2.61 (2H, m, 6-H, 9-H)、5.10 (1H, d, $J=3.0\text{ Hz}$, 5-H)、5.88 (1H, m, 4-H)、6.39 (1H, dd, $J=1.5$, 6.0 Hz, 2-H)、7.41 (1H, dd, $J=2.5$, 6.0 Hz, 3-H)

25 但し、重クロロホルムの残留プロトンの化学シフト値を7.24 ppmとして表した。

図1にジイソブチリルシクロペンテノンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図1において横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

なお、 $^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルの帰属の番号は下記式 [I I I] の通りである。

25



[I I I]

(18) シクロペンテノン 1. 5 g を 200 ml のジクロロメタンに溶解し、
 メトキシ酢酸 (ナカライテスク社製) 2. 7 g、DMAP 794 mg、ジシクロ
 ヘキシルカルボジイミド (DCC: ナカライテスク社製) 5. 36 g を加えた。
 室温で 2 時間反応後減圧下濃縮して酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸及び飽
 和重曹水溶液で洗浄した。これを減圧下濃縮し、ヘキサン: 酢酸エチル = 2 : 3
 を展開溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、ヘキサン: 酢
 酸エチル = 1 : 1 を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーで $R_f =$
 0. 34 のスポットを与える画分を得た。本画分の溶媒を減圧下留去し、高純度
 のジメトキシアセチルシクロペンテノンを含む 300 mg の油状物を得た。

得られたジメトキシアセチルシクロペンテノンを重クロロホルムに溶解し、核
 磁気共鳴による構造解析を実施例 1 - (2) に従い行った。その結果を以下に示
 す。

¹H-NMR

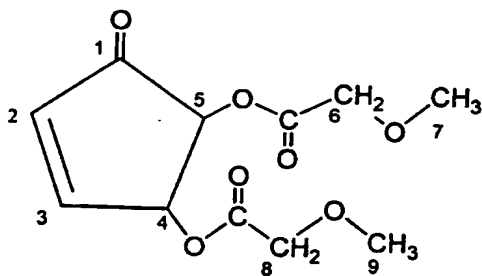
δ 3. 45 (6H, s, 7-H, 9-H)、4. 13 (4H, m, 6-H, 8-H)、5. 30 (1H, d, $J = 3. 0$ Hz, 5-H)、5. 99 (1H, m, 4-H)、6. 44 (1H, dd, $J = 1. 5, 6. 5$ Hz, 2-H)、7. 46 (1H, dd, $J = 2. 0, 6. 5$ Hz, 3-H)

但し、重クロロホルムの残留プロトンの化学シフト値を 7. 24 ppm として表した。

図 2 にジメトキシアセチルシクロペンテノンの¹H-NMR スペクトルを示す。
 図 2 において横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

なお、¹H-NMR におけるシグナルの帰属の番号は下記式 [I V] の通りである。

26



〔IV〕

(19) シクロペンテノン 1. 1 g を 200 ml のジクロロメタンに溶解し、メチルマレイン酸 3. 4 g、DMAP 610 mg、ジシクロヘキシルカルボジイミド 4. 12 g、を加えた。室温で 2 時間反応後減圧下濃縮して酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸及び飽和重曹水溶液で洗浄した。これを減圧下濃縮し、ヘキサン：酢酸エチル=3：2を展開溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、ヘキサン：酢酸エチル=1：1を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーで $R_f = 0.6$ のスポットを与える画分および $R_f = 0.45$ のスポットを与える画分を得た。

両画分の溶媒をそれぞれ減圧下留去し、 $R_f = 0.6$ の画分より高純度のジメチルフマリルシクロペンテノンを含む 300 mg の固体物、及び $R_f = 0.45$ の画分より高純度のジメチルマレイルシクロペンテノンを含む 300 mg の油状物を得た。

それぞれを重クロロホルムに溶解し、核磁気共鳴による構造解析を実施例 1 - (2) に従って行った。その結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$

ジメチルフマリルシクロペンテノン

δ 3. 80 (6H, s, 10-H, 15-H)、5. 31 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, 5-H)、6. 03 (1H, m, 4-H)、6. 48 (1H, dd, $J = 1.0, 6.0$ Hz, 2-H)、6. 90 (4H, m, 7-H, 8-H, 12-H, 13-H)、7. 50 (1H, dd, $J = 2.0, 6.0$ Hz, 3-H)

ジメチルマレイルシクロペンテノン

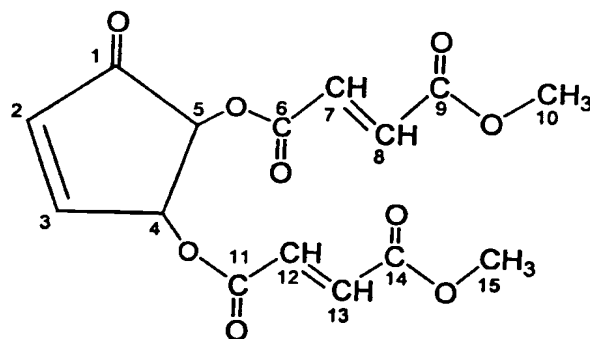
δ 3. 76 (6H, s, 10-H, 15-H)、5. 31 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, 5-H)、6. 07 (1H, m, 4-H)、6. 31 (4H, m, 7-H, 8-H, 12-H, 13-H)、6. 44 (1H, dd, $J = 1.5, 6.0$ Hz, 2-H)

0 Hz, 2-H)、7.58 (1H, dd, $J=2.0, 6.0$ Hz, 3-H)

但し、重クロロホルムの残留プロトンの化学シフト値を7.24 ppmとして表した。

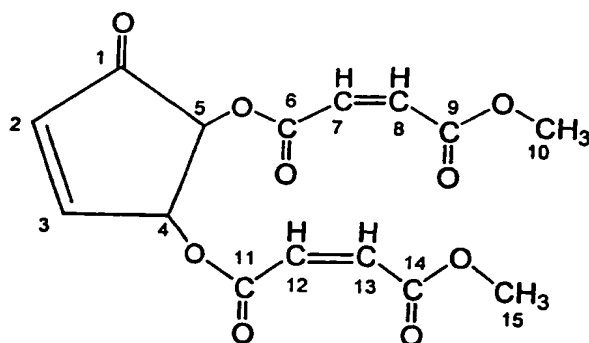
図3にジメチルフマリルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す。
 また図4にジメチルマレイルシクロペンテノンの ^1H -NMRスペクトルを示す。
 図3、図4において横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

なお、ジメチルフマリルシクロペンテノンの ^1H -NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式〔V〕の通りである。



〔V〕

また、ジメチルマレイルシクロペンテノンの ^1H -NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式〔VI〕の通りである。



〔VI〕

(20) シクロペンテノンの1M水溶液100 μl と200mMグルタチオン
 (還元型：ナカライテスク社販売：170-10) 水溶液 (pH 3.0) 500
 μl を混合し、60℃で5時間反応させた。この反応液を0.5 μm コスモナイス
 フィルターでろ過し、以下の条件でHPLCで分離した。

カラム: TSK gel ODS-80Ts ($5\mu\text{m}$)、 $20\text{mm}\times 25\text{cm}$

移動相: A 0.1% TFA水溶液

B 0.1% TFA/50% アセトニトリル水溶液

流速: $7.5\text{ml}/\text{分}$

- 5 グラジエント: 10分間移動相A→55分かけて移動相AからA:B=1:1
→15分かけて移動相A:B=1:1から移動相B

検出: 220nm における吸光度

上記反応液 $200\mu\text{l}$ をHPLCにかけ、保持時間35.7、36.1分のピークを分取し、それぞれ減圧下濃縮乾固し、乾固物 5.5mg を得た。

- 10 この乾固物の構造を解析した。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルはJNM-A500 (日本電子社製)、質量スペクトル (MS) はDX302質量分析計 (日本電子社製)、紫外 (UV) 吸収スペクトルはUV-2500分光光度計 (島津製作所製)、赤外吸収 (IR) スペクトルはFTIR-8000PC赤外分光光度計 (島津製作所製) を用いて測定した。その結果を以下に示す。

- 15 ^1H -NMR

δ 2.09 (2H, m, 5'-H), 2.28 (1H, dd, $J=13.0$, 20.0Hz , 5-H), 2.44 (2H, m, 4'-H), 2.78 (1H, dd, $J=8.5$, 14.0 , 1'-H), 2.85又は2.89 (1H, dd, $J=3.0$, 6.0Hz , 5-H), 2.92又は2.95 (1H, dd, $J=1.0$, 5.5Hz , 1'-H), 3.86 (2H, s, 9'-H), 3.95 (2H, m, 4-H, 6'-H), 4.46 (1H, m, 2'-H), 6.47又は6.49 (1H, d, $J=3.0\text{Hz}$, 3-H)

試料は0.1N DCl重水溶液に溶解し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

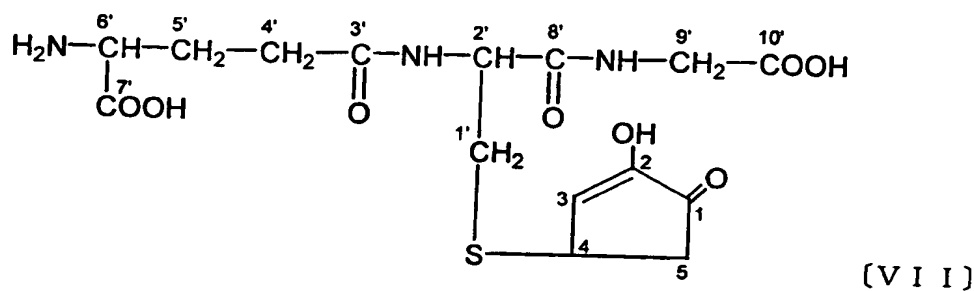
- 25 ^{13}C -NMR

δ 26.3 (5'-C), 31.7 (4'-C), 31.9又は32.1 (1'-C), 39.3 (4-C), 41.9 (9'-C), 42.2又は42.3 (5-C), 53.3 (6'-C), 54.1 (2'-C), 133.5 (3-C), 154.4 (2-C), 173付近 (3'-C, 7'-C, 8'-C,

10' -C), 205.8 (1-C)

試料は0.1N DCl重水溶液に溶解し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

5 なお、¹H-NMR、¹³C-NMRのピークの帰属の番号は下記式〔VII〕のとおりである。



FAB-MS

m/z 404 (M+H)⁺, 426 (M+Na)⁺

10 グリセロールをマトリックスに用いた。

UV λ_{max} 251 nm (水)

IR ν_{max} cm⁻¹ 2949, 1710, 1660, 1539, 1404, 1203

拡散反射法によって行った。

15 以上の結果から、乾固物は2-ヒドロキシ-4-グルタチオン-S-イル-2-シクロペンテン-1-オン (2-hydroxy-4-glutathion-S-yl-2-cyclopenten-1-one : 以下、単にGMと称する) であった。

実施例2

20 56℃、30分間処理したウシ胎児血清 (FCS : JRH社製) を10%含む RPMI 1640培地 (BIO WHITTAKER社製) にて37℃で培養したHL-60 (ATCC CCL-240) をRPMI 1640培地にて2.5 × 10⁵細胞/5mlとなるように懸濁した。

25 この懸濁液5mlに対し、様々な濃度に希釈したジイソブチリルシクロペンテン、ジメトキシアセチルシクロペンテン、ジメチルフマリルシクロペンテン、ジメチルマレイルシクロペンテンのそれぞれ70%エタノール水溶液を1

0 μ l 添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で、24時間培養した。また確認のためアポトーシスを誘発する試薬として知られているアクチノマイシンD（シグマ社製）の水溶液（0.5 mg/ml）10 μ l を上記の試料の代わりに用いて同様の培養を行った。

- 5 培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、試料、及びアクチノマイシンD添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の70%エタノール水溶液10 μ l 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

- 10 さらに、上記と同様の方法で培養した細胞を一部サンプリングし、0.4%トリパンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察し、染色されていない生細胞と青く染色された死細胞の細胞数の測定を行い、生残率が50%になる各サンプルの濃度（生残率₅₀ μ M）をもとめ、表1に示した

表1

サンプル名	生残率 ₅₀ (μ M)
ジイソブチリルシクロペンテノン	8.8
ジメトキシアセチルシクロペンテノン	14
ジメチルフマリルシクロペンテノン	2.9
ジメチルマレイルシクロペンテノン	3.4

- 15 以上、各化合物はがん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性を示した。また各化合物の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

実施例3

- 20 (1) トポイソメラーゼII [トポジェン (TopoGEN) 社製、2単位/ μ l] 2 μ l、10倍濃度緩衝液 [0.5M Tris-HCl (pH8.0)、1.2M KCl、0.1M MgCl₂、2.5mM アデノシン三リン酸、5mM ジチオスレイトール] 2 μ l、0.1%ウシ血清アルブミン（宝酒造社製）2 μ l、蒸留水11 μ l 及び対照の蒸留水又は水で様々な濃度に調製したジプロピオニルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジベンゾイ

ルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジメトキシアセチルシクロペンテノン、ジメチルフマリルシクロペンテノン、ジメチルマレイルシクロペンテノン 2 μ l を混合したものに、0.25 μ g/ μ l pBR322 DNA (宝酒造社製) 1 μ l を添加して37℃で反応させた。30分間反応後、1%ドデシル硫酸ナトリウム、50%グリセロール、0.02%プロモフェノールブルー水溶液 2 μ l を添加して反応を停止した。

アガロース L03 (宝酒造社製) と TAE 緩衝液 [40 mM Tris、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、酢酸で pH 7.8 に調整] を用いて作製した 1% アガロースゲルに上記反応液 20 μ l をアプライし、TAE 緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 1 μ g/ml エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射して DNA 電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照では DNA が超螺旋型から弛緩型に完全に変化するが、トポイソメラーゼ II 活性が阻害されると超螺旋型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果、水添加の対照では DNA が超螺旋型から弛緩型に完全に変化した。0.1 μ M 以上のジプロピオニルシクロペンテノン、1 μ M 以上のジイソブチリルシクロペンテノン、1 μ M 以上のジベンゾイルシクロペンテノン、10 μ M 以上のジヘキサノイルシクロペンテノン、10 μ M 以上のジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、50 μ M 以上のジメトキシアセチルシクロペンテノン、10 μ M 以上のジメチルフマリルシクロペンテノン、5 μ M 以上のジメチルマレイルシクロペンテノンによって DNA の超螺旋型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、各シクロペンテノン誘導体のトポイソメラーゼ II 阻害活性が確認された。

(2) 実施例 3-(1) と同様の方法で各シクロペンテノン誘導体のトポイソメラーゼ I 阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼ II の代わりにトポイソメラーゼ I [トボジェン社製、0.01 単位/ μ l]、10 倍濃度緩衝液として 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM EDTA、1 mM スペルミジン、50% グリセロールを用いた。

その結果、水添加の対照ではDNAが超螺旋型から弛緩型に完全に变化したが、
1000 μ M以上のジプロピオニルシクロペンテノン、500 μ M以上のジイソ
ブチリルシクロペンテノン、50 μ M以上のジベンゾイルシクロペンテノン、1
000 μ M以上のジヘキサノイルシクロペンテノン、500 μ M以上のジ-2-
5 ヘキセノイルシクロペンテノン、1000 μ M以上のジメトキシアセチルシクロ
ペンテノン、1000 μ M以上のジメチルフマリルシクロペンテノン、1000
 μ M以上のジメチルマレイルシクロペンテノンによってDNAの超螺旋型から弛
緩型への変化が一部又は完全に阻害され、各シクロペンテノン誘導体のトポイソ
メラーゼI阻害活性が確認された。

10 以上、正常細胞では分裂期の一過的に発現しているが、がん化により全細
胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼIIに、上記シクロペンテ
ノン誘導体及び実施例1に記載の他のシクロペンテノン誘導体は阻害活性を示し
た。また、トポイソメラーゼII阻害活性は、がん化により発現量や活性が増大す
るトポイソメラーゼIへの阻害活性に比べ、強い阻害活性を示した。

15 また、上記化合物の光学活性体及びそれらの塩も同様のトポイソメラーゼII特
異的阻害活性を示した。

実施例4

(1) 2×10^5 細胞/mlのHL-60 (ATCC CCL-240) を含む10%牛胎
児血清含有RPMI 1640培地5mlを6ウェルプレートの各ウェルに入れ、
20 37℃5%CO₂存在下で24時間培養した後、最終濃度が、0、0.63、1.
3、2.5、5、10、20 μ Mになるようにジプロピオニルシクロペンテノン、
ジイソブチリルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノンを添
加し、更に6時間培養を続けた。

25 培養終了後、細胞数を計測した後、細胞を遠心分離で回収し、PBSで洗浄し
て、各試料処理細胞を調製した。また、45℃10分間熱処理を行った後、同様
に培養した細胞も調製した。

これらの処理細胞を用い、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning)
[コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring
Harbor Laboratory Press) (1989)] 記載の方法に従ってSDS-PAGEを行った。

処理細胞は、 2.5×10^6 細胞/ml になるように SDS-PAGE Sample buffer に懸濁し、この細胞懸濁液を 100°C で 10 分間処理した後、 $5 \mu\text{l}$ ずつを 2 枚の SDS-PAGE ゲル (5% スタッキングゲル、10% セパレーションゲル) にアプライし、電気泳動を行った。一方のゲルは、クマシー染色し、他方のゲルは、

5 Polyvinylidene difluoride transfer membrane [ImmobilonTM : ミリポア (MILLIPORE) 社製 Cat.# IPVH000-10] にブロッティングした。このメンブレンを Block Ace (大日本製薬株式会社 Cat.# UK-B25) で 4°C 一晩ブロッキングした。

10 このブロッキングしたメンブレンに熱誘導される 70 kDa の熱ショックタンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体 HSP 72/73 (Ab-1) [オンコジーン リサーチ プロダクツ (Oncogene Research Products) 社製 Cat.# HSP01] を反応させた後、0.05% Tween 20 を含む TBS で洗浄し、更に、TBS で洗浄した。次いで、Peroxidase 複合二次抗体 HRP-Rabbit Anti Mouse IgG (H+L) [ZYMED ラボラトリーズ社 (ZYMED Laboratories, Inc.) 製 Cat.# 61-6520] を反応させ、先の操作と同様に洗浄した。このように一次抗体、二次抗体
15 と反応させたメンブレンに、ケミルミノール試薬 RENAISSANCETM [デュポン NEN (Dupont NEN) 社製 Cat.# NEL-100] を反応させた後、X-Ray フィルムを感光して 70 kDa の熱ショックタンパクの誘導を確認した。

20 その結果、 70 kDa の熱ショックタンパクの誘導が確認された。その誘導の強弱は表 2 に示した。なお表 2 中、+ は誘導の強さを表し、+ が多いほど誘導が強いことを意味する。また - は誘導が認められなかったこと、± は誘導がわずかであることを意味する。

表 2

シクロペンテノン 誘導体	濃度 (μ M)					
	0.63	1.3	2.5	5	10	20
ジプロピオニル シクロペンテノン	—	±	+	+++	++	++
ジイソブチリル シクロペンテノン	±	+	+++	+++	+	+
ジ-2-ヘキセノイル シクロペンテノン	±	+	++	+++	±	—

なお、未処理のコントロールは—、45℃5分間熱処理は++であった。以上
 上記化合物は低濃度で熱ショックタンパクの誘導活性を示した。またその光学活
 5 性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。更に他のシクロペンテノン誘導体若
 しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

実施例 5

ジプロピオニルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジ-2
 ーヘキセノイルシクロペンテノンを用いてカンジダ・アルビカンズ T IMM01
 10 36 に対する抗真菌活性を調べた。

カンジダ・アルビカンズはイーストナイトロジェンベース（ディフコ社製）0.
 67%、グルコース1.0%を含有するYNBG培地で1晩培養した（種培養）。
 次に新鮮なイーストナイトロジェンベース培地で 1×10^6 細胞/mlとなるよ
 うに培養液を希釈し、96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに100
 15 μ lずつ分注した。

ジプロピオニルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジ-2

ーヘキセノイルシクロペンテノンの各々 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ の70%エタノール溶液又は70%エタノール溶液を各ウェルに $10\mu\text{l}$ ずつ加え、 30°C で48時間生地培養した（本培養）。

5 ジプロピオニルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジ-2-
ーヘキセノイルシクロペンテノンは各々 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ でカンジダ・アルビカ
ンスの増殖を抑制し、最小生育阻害濃度は各々 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、これら
の化合物は抗真菌剤の有効成分として有用である。またこれらのシクロペンテノ
ン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

実施例6

10 ヒト血管内皮細胞（三光純薬社販売）を10%FCS（ハイクローン社製）を
含むRPMI-1640培地（ギブコ社製）に懸濁して 1×10^5 細胞/ ml に
調整し、96ウェルマイクロタイタープレートに $100\mu\text{l}$ /ウェルで播種した。

15 37°C 5% CO_2 インキュベーターで2日間培養して単層になった血管内皮
細胞に $100\text{U}/\text{ml}$ のヒトリコンビナントTNF- α （プロメガ社製）を加え、
 37°C 5% CO_2 インキュベーターで6時間培養し、TNF- α で刺激した血管
内皮細胞を調製した。

20 一方、10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁して 1×10^5 細胞
/ ml に調整したHL-60細胞に各濃度のシクロペンテノン、GMまたはジプロ
ピオニルシクロペンテノンを添加して 37°C 5% CO_2 インキュベーターで
3時間培養した。培養終了後、蛍光剤として $5\mu\text{M}$ の 5(-and-6)-
carboxyfluorescein diacetate, succinimidyle ester（モレキュラープローブ社
製）を加え 37°C で10分間反応させた後、RPMI-1640培地で細胞を2
回洗浄し、10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁して 1×10^5 細胞
/ ml の蛍光標識したHL-60細胞液を調整した。

25 TNF- α で刺激した血管内皮細胞に蛍光標識したHL-60細胞を $100\mu\text{l}$
/ ウェル で重層し、各濃度のシクロペンテノン、GMまたはジプロピオニルシ
クロペンテノンを添加して 37°C 5% CO_2 インキュベーターで20分間イン
キュベートし、血管内皮細胞とHL-60細胞の接着反応を行った。

接着反応後、プレートを洗浄して非接着細胞を除去し、1%トリトンX（ナカ

ライテスク社製)を加えて接着細胞を壊し、485/22nm(励起用)、530/25nm(測定用)の各フィルターを用いて蛍光強度を測定した。

蛍光標識した 1×10^5 個の細胞の蛍光強度を100%とし、血管内皮細胞に接着した細胞の接着率を求めた。

5 結果を表3に示す。血管内皮細胞はTNF- α 刺激によりHL-60との接着率が増加した。この接着率の増加はシクロペンテノン、GM、ジプロピオニルシクロペンテノンにより、 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ Mの濃度において用量依存的に抑制され、シクロペンテノン、GM、ジプロピオニルシクロペンテノンはがん転移抑制に必要な、がん細胞と血管内皮細胞の接着抑制作用を示した。またこれらの化合物の
10 光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

表 3

被検物質	濃度 (μ M)	接着率 (%)
対照		
非刺激		3. 6
TNF- α 刺激		50. 9
シクロペンテノン	0. 1	51. 7
	1	46. 0
	10	22. 2
	100	17. 9
GM	0. 1	53. 9
	1	48. 3
	10	23. 9
	100	16. 3
ジプロピオニル シクロペンテノン	0. 1	49. 2
	1	35. 1
	10	15. 3
	100	15. 5

実施例 7

5 ddYマウス（雌性、7週齢）は日本エスエルシー社より購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。

マウスの腹腔内に 1×10^6 細胞のエアリッヒがん細胞を接種し、接種1日後に 10 mg/kg のシクロペンテノン、 30 mg/kg のGMまたは 10 mg/kg のジプロピオニルシクロペンテノンを腹腔内投与した。また対照には生理食塩水を投与した。

10

がん細胞接種から10日後にマウスより脾臓を摘出した。脾臓は細かく粉碎して10%FCS（ハイクローン社製）を含むRPMI-1640培地（ギブコ社

製)に懸濁して単細胞液を得た。細胞液中の接着細胞をプラスチックプレートに接着させて除き、得られた非接着細胞を脾臓リンパ球として以下用いた。

5 脾臓リンパ球は10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁して 2×10^6 細胞/mlに調整し、100 μ l/ウェルでマイクロタイタープレートに播種した。

10 刺激細胞は次のように調製した。RPMI-1640培地に懸濁して 2×10^6 細胞/mlに調整したエーリッヒがん細胞にマイトマイシンC(協和発酵社製)を50 μ g/mlの濃度で添加し、37℃で30分間処理し、2回洗浄後、10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁し、 2×10^6 細胞/mlの刺激細胞を調整した。

15 調製した刺激細胞100 μ lを、100 μ l/ウェルで脾臓リンパ球を加えたプレートの各ウェルに重層し、5日間37℃ 5%CO₂インキュベーターで培養した。培養終了1日前に³H-チミジン(第一化学薬品社製)37kBqを各ウェルに添加し、パルスラベルを行い、培養終了後、各細胞をガラスフィルターに回収して放射活性を測定した。

20 結果を表4に示す。シクロペンテノン、GM及びジプロピオニルシクロペンテノンおよび投与マウスより得られた各脾臓リンパ球は、がん細胞刺激により増殖が著明に促進され、がん細胞に特異的に反応するリンパ球が誘導されていることが示唆された。またこれらの化合物の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

表 4

被検物質	投与量 (mg/kg)	がん細胞刺激	³ H-チミジン 取り込み量 (CPM)
対照		-	1 0 4 9 2
		+	8 8 0 6
シクロペンテノン	1 0	-	9 6 8 0
		+	2 5 7 5 6
GM	3 0	-	8 7 0 0
		+	3 6 2 9 1
ジプロピオニル シクロペンノン	1 0	-	9 2 5 0
		+	2 0 7 4 8

実施例 8

5 ddYマウス（雌性、7週齢）は日本エスエルシー社より購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。

マウスの腹腔内に 1×10^6 個のエーリッヒがん細胞を接種し、接種1日後に 10 mg/kg のシクロペンテノン、 30 mg/kg のGMまたは 10 mg/kg のジプロピオニルシクロペンテノンを腹腔内投与した。また対照は生理食塩水を投与した。

10 がん細胞接種から10日後にマウスから脾臓を摘出した。脾臓は細かく粉碎して10%FCS（ハイクローン社）を含むRPMI-1640培地に懸濁して単細胞液を得た。細胞液から接着細胞をプラスチックプレートに接着させて除き、非接着細胞をNK細胞として用いた。

15 NK細胞は10%FCSを含むRPMI-1640培地に懸濁して 6×10^6 細胞/mlに調整し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルでマイクロタイタープレートに播種した。

標的細胞の調製は次のように行った。 1×10^6 細胞のYAC-1細胞（大日

本製薬社販売) に 3700 kBq の ^{51}Cr (アマシヤム社製) を加え 37°C で 1 時間培養して標識した。標識した細胞は 2 回洗浄後、 10% FCS を含む RPMI-1640 培地に懸濁して 2×10^5 細胞/ ml に調整した。

調製した標的細胞 $100 \mu\text{l}$ を、NK 細胞を加えたプレートの各ウェルに重層し、5 時間 37°C 5% CO_2 インキュベーターで培養した。培養後、プレートを 1500 rpm 、5 分間遠心し、上清 $100 \mu\text{l}$ をガンマーカウンターチューブに回収して放射活性 (実験値) をオートガンマーカウンターで測定した。

標的細胞から自然放出される放射活性 (対照値) を測定するためには、NK 細胞の代わりに反応系に培養液 $100 \mu\text{l}$ を加え放射活性を測定した。

また、反応系に含まれる総放射活性 (総放射活性値) を測定するためには、 1% トリトン X (ナカライテスク社製) を反応系に加えて ^{51}Cr 標識 YAC-1 細胞を溶解させたときに上清に放出される放射活性を測定した。

したがって、NK 細胞による特異的な細胞傷害率 (%) は次の計算式によって求めることができる

$$\text{細胞傷害率 (\%)} = \left[\frac{(\text{実験値} - \text{対照値})}{(\text{総放射活性値} - \text{対照値})} \right] \times 100$$

結果を表 5 に示す。シクロペンテノン、GM 及びジプロピオニルシクロペンテノン投与マウスにおいて NK 細胞の活性化が認められ、これらの化合物の投与により、生体の免疫防御機構が高まり、がん細胞に対する傷害活性が上昇した。またこれらの化合物の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

表 5

被検物質	投与量(mg/kg)	細胞傷害率 (%)
対照		3.5
シクロペンテノン	10	15.5
GM	30	19.0
ジプロピオニル シクロペンテノン	10	13.5

実施例 9

5 ルイスラット（雄性、9週齢、体重約250g）はセアック吉富社（株）より購入した。

10 実験開始18時間前から絶食したラットにオリーブ油（ナカライテスク社製）に溶解して、1又は10mg/10ml/kgとなるように調製したジプロピオニルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン又はジベンゾイルシクロペンテノンを各群4匹のラットに経口投与した。

15 被験物質投与0.5時間後に生理食塩水（大塚製薬社製）に1%の濃度で懸濁したλ-カラゲナン（和光純薬社製）100μlをラットの右足足蹠に注射し、足浮腫を惹起した。カラゲナン注射3時間後にラットの右足容積をラット足容積測定装置（ウゴバジール社製）で測定した。なお測定値はカラゲナン投与前に測定した各ラットの右足容積から増加率を算定して表示した。

結果を図5に示す。すなわち図5は投与したシクロペンテノン誘導体量と足浮腫増加率の関係を示す図であり、横軸は投与量（mg/kg）、縦軸は増加率（%）を示す。

20 ジプロピオニルシクロペンテノンは1mg/kgの投与量で足浮腫の抑制傾向が認められ、10mg/kgの投与により有意な抑制作用を示した。ジヘキサノ

イルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノンはそれぞれ1又は10 mg/kgの投与量で有意な抑制作用を示した。ジイソブチリルシクロペンテノン、ジベンゾイルシクロペンテノンはそれぞれ1 mg/kgの投与量で抑制傾向を示し、10 mg/kgの投与量で有意な抑制作用を示した。またこれらのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

図5において*は対照群に比べて $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の有意差があることを示す。

実施例10

C57BL/6マウス（雄、7週齢、体重約25g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育後、実験に用いた。

惹起抗原であるヒツジ赤血球（清水実験材料）を生理食塩水（大塚製薬）で3回洗った後、生理食塩水で 1×10^9 細胞/mlに調整し、200 μ lをマウスの腹腔内に注射して抗原感作した。感作から5日後に同様に調整した抗原40 μ lを右足肉趾に注射して抗原誘発し、足浮腫を惹起した。

ジプロピオニルシクロペンテノンは生理食塩水に溶解して各濃度に調整し、1群5匹のマウスに抗原感作日から1日1回、3日間腹腔内または経口投与した。抗原誘発から2日後にマウスの右足容積を足浮腫測定装置（ウゴバジル社）で測定してDTHの指標とした。測定値は下記の式により抗原誘発前に測定したマウスの右足容積から増加率を算定して表示した。

増加率 = (抗原誘発後右足容積 - 抗原誘発前右足容積) / 抗原誘発前右足容積

結果を図6に示す。図の縦軸は抗原誘発により増加した足容積の増加率を示す。ジプロピロニルシクロペンテノンは1 mg/kgの腹腔内投与により、足浮腫の抑制傾向を示し、10 mg/kgの腹腔内投与、または30 mg/kgの経口投与で有意な抑制を認めた。また、これらのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

図6において、*は対照群に比べて $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の有意差があることを示す。

実施例11

(1) ddYマウス（雄性、7週齢：日本エスエルシー社より購入）より脾臓を摘出し、細かく粉砕して10%FCS（ハイクローン社製）を含んだRPMI-1640培地に懸濁して単細胞液を得た。細胞浮遊液をプラスチックシャーレに播種して炭酸ガス培養器で37℃、2時間培養し、接着性細胞をシャーレに接着させて除き、非接着性細胞を脾臓リンパ球として用いた。細胞濃度を 2×10^6 細胞/mlに調整し、96ウエルマイクロタイタープレートに200μl/ウエルで播種し、対照群以外の各ウエルに、各濃度のジプロピオニルシクロペンテノンを添加し、さらにすべてのウエルに5μgのConA（ナカライテスク社製）を添加し、炭酸ガス培養器で37℃、1日間培養した。培養後1μCiの³H-チミジンを各ウエルに加えさらに1日間培養して細胞への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

その結果を図7に示す。すなわち、図7はジプロピオニルシクロペンテノン濃度と³H-チミジン取り込み量の関係を示す図であり、横軸はジプロピオニルシクロペンテノン濃度（μM）、縦軸は³H-チミジン取り込み量（CPM）を示す。白棒グラフは刺激なしの場合の、斜線棒グラフはConAにより刺激した場合の³H-チミジン取り込み量を示す。図7から明かなように、マイトジェン刺激マウスリンパ球の増殖に対しジプロピオニルシクロペンテノンは用量依存的な抑制作用を示し、10μMでほぼ完全に抑えた。またこのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

(2) BALB/cマウス（雄性、6週齢：日本エスエルシー社より購入）およびC57BL/6マウス（雄性、6週齢：日本エスエルシー社より購入）より脾臓を摘出し、実施例11-（1）の方法により脾臓リンパ球を得た。各細胞浮遊液の濃度を 2×10^6 細胞/mlに調整し、100μlずつを混合して96ウエルマイクロタイタープレートに播種した。対照群以外の各ウエルに各濃度のジ

プロピオニルシクロペンテノン を添加し、炭酸ガス培養器で 37℃、4 日間培養した。培養後 1 μ Ci の 3 H-チミジン を各ウェルに加え、さらに 1 日間培養して細胞への取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

その結果を図 8 に示す。すなわち、図 8 はジプロピオニルシクロペンテノン濃度と 3 H-チミジン取り込み量の関係を示す図であり、横軸はジプロピオニルシクロペンテノン濃度 (μ M)、縦軸は 3 H-チミジン取り込み量 (CPM) を示す。白棒グラフはいずれかの系統由来の細胞を単独で用いた場合の 3 H-チミジン取り込み量を、斜線棒グラフは両系統由来の細胞を混合した場合の 3 H-チミジン取り込み量を示す。図 8 から明かなように、アロ抗原刺激により活性化されたリンパ球に対してジプロピオニルシクロペンテノンは用量依存的な抑制作用を示し、1 μ M でほぼ完全に抑えた。またこのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

実施例 12

(1) 8 週齢の雌性 CDF1 系マウス (日本エスエルシー社より購入) を用いてエンドトキシンショックモデルを作製した。マウスに蒸留水 (対照) 又は 10 mg/kg のジイソプロピオニルシクロペンテノン若しくはジイソブチルシクロペンテノンを皮下投与し、その 30 分後に LPS (リポポリサッカライド: シグマ社) を腹腔内投与 (20 μ g/マウス) した。LPS 投与 1.5 時間後にマウスより採血し、血清を分離し、血清中腫瘍壊死因子 (TNF) - α 量を市販の ELISA キット (R&D 社製) にて測定した。なお各群 4 匹のマウスを使用した。

結果を表 6 に示す。

表 6

群	投与量 (mg/kg)	TNF量 (ng/ml) 平均 ± SE
対照		7.53 ± 0.48
ジイソプロピオニル シクロペンテノン	10	4.61 ± 0.57**
ジイソブチリル シクロペンテノン	10	3.39 ± 0.33***

蒸留水を投与した対照群に対し、10 mg/kg のジイソプロピオニルシクロペンテノン又はジイソブチリルシクロペンテノンを投与した群で有意にTNF- α 産生が抑制された。表6において、**は対照群に比べて $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ の有意差があることを示す。またこれらのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

(2) 8週齢の雌性CDF1系マウスを用いLPSを腹腔内投与(20 μ g/マウス)し、エンドトキシンショックモデルを作製した。ジプロピオニルシクロペンテノンあるいはジイソブチリルシクロペンテノンは、LPS投与の30分前にそれぞれ30, 100 mg/kg の用量で経口投与した。LPS投与1.5時間後にマウスから採血、血清を分離し、血清中TNF- α をELISAキットにて測定した。なお1群4匹のマウスを用いた。

結果を表7に示す。すなわち、コントロール群に対して、ジプロピオニルシクロペンテノンあるいはジイソブチリルシクロペンテノンは、TNF産生を経口投与で用量依存性に抑制した。またこれらのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

表 7

群	投与量 (mg/kg)	TNF (ng/ml) 平均 ± SE
コントロール	—	5.72 ± 1.02
ジプロピオニル シクロペンテノン	30	2.95 ± 0.14 *
	100	1.26 ± 0.15 **
ジイソブチリル シクロペンテノン	30	3.92 ± 0.13
	100	2.48 ± 0.43 *

*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs コントロール

実施例 13

5 (1) マウス白血病 P-388 (1.1×10^6 細胞/マウス) を 7 週齢の雌性 DBA/2 マウスに腹腔内注射した。その直後、ジプロピオニルシクロペンテノンを 10 mg/kg の用量で一回腹腔内注射した。一方対照群には生理的食塩水を同様に腹腔内注射した。それぞれ 8 匹ずつの 2 群において、マウスの生存数、平均生存日数、延命率を算定した。

10 その結果、対照群では平均生存日数が 10.1 日であったのに対し、ジプロピオニルシクロペンテノン投与群では 13.9 日で、その延命率は 137.0% を示し、有意な延命効果が認められた。

15 同様に、Meth A 腫瘍細胞: BALB/c マウスの系を用いて検討した。その結果、対照群の平均生存日数は 13.4 日、ジプロピオニルシクロペンテノン投与群では 16.9 日であった。延命率は 126.2% で、顕著な延命効果を示した。

また、このシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

20 更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

(2) マウス固形がん Meth A (2×10^6 cells/マウス) を 8 週齢

の雌性BALB/cマウスの背部皮下に注射した。その後、引続いて同じ箇所
5日間連続してジプロピオニルシクロペンテノンを経口注射した。また対照群
には生理的食塩水を同様に皮下注射した。なお各群8匹のマウスを使用した。

2週間後にマウス背部に形成されたがん組織を摘出して、その重量を測定した。

5 その結果を表8に示す。すなわち対照群では平均がん重量は0.61gであつ
たのに対し、ジプロピオニルシクロペンテノン投与群では0.05gで抑制率は
92.3%であった。また8匹中5匹はがん組織の形成を全く示さなかった。ま
たこのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示し
た。

10 更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれら
の塩も同様の活性を示した。

表8

群	がん重量 (g) 平均 ± SE	抑制率 (%)
対照	0.61 ± 0.20	—
ジプロピオニル シクロペンテノン	0.05 ± 0.08	92.3

15 (3) エーリッヒがん (EAC)、Meth Aの2種を用い、各種腹水型が
んに対するジプロピオニルシクロペンテノンおよびジイソブチルシクロペンテ
ノンの制がん作用を、いくつかの投与量で腹腔内投与あるいは経口投与において
検討した。腹腔内移植細胞数および宿主動物を表9に示した。

表9

がん細胞	マウス	移植細胞数
EAC	ddY (雌性、5週齢)	1.2×10^6
Meth A	BALB/c (雌性、7週齢)	2.0×10^6

ジプロピオニルシクロペンテノンあるいはジイソブチルシクロペンテノンはそれぞれ、がん細胞移植の翌日より5日間連続して腹腔内あるいは経口投与した。コントロール群には同様に注射用蒸留水を投与した。各群8匹を用い平均生存日数、延命率および30日間生存数を算定した。

5 結果を表10～13に示した。表10はEAC移植マウスに各被検物質を腹腔内投与したときの延命効果を示し、表11はMeth A移植マウスに各被検物質を腹腔内投与したときの延命効果を示し、表12はEAC移植マウスに各被検物質を経口投与したときの延命効果を示し、表13はMeth A移植マウスに被検物質を経口投与したときの延命効果を示す。

10 すなわち、EAC移植マウスにおいてジプロピオニルシクロペンテノンおよびジイソブチルシクロペンテノンは優れた延命効果を示し、特に腹腔内投与において、いずれの群も30日間生存例を出現させた。さらにジプロピオニルシクロペンテノンは経口投与においても強い効果を示した。

15 又、Meth A移植マウスにおいては各治療群は腹腔内投与で延命効果を示し、更にジプロピオニルシクロペンテノン投与群では経口投与において30日間生存例を示した。

またこれらのシクロペンテノン誘導体の光学活性体及びそれらの塩も同様の活性を示した。

20 更に、上記以外のシクロペンテノン誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩も同様の活性を示した。

表10

群	投与量 (mg/kg)	平均生存日数 (日)	延命率 (%)	30日 生存例数
コントロール		12.5	100	0
ジプロピオニル シクロペンテノン	10	28.1	>225	6
ジイソブチル シクロペンテノン	30	25.3	>202	3
	10	17.0	136	0

表 1 1

群	投与量 (mg / k g)	平均生存日数 (日)	延命率 (%)	30日 生存例数
コントロール		11.8	100	0
ジプロピオニル シクロペンテノン	10	20.5	174	0
ジイソブチル シクロペンテノン	10	15.5	132	0

表 1 2

群	投与量 (mg / k g)	平均生存日数 (日)	延命率 (%)	30日 生存例数
コントロール		12.5	100	0
ジプロピオニル シクロペンテノン	30	24.1	>193	4
ジイソブチル シクロペンテノン	100	20.9	167	0
	30	15.1	121	0

表 1 3

群	投与量 (mg / k g)	平均生存日数 (日)	延命率 (%)	30日 生存例数
コントロール		11.8	100	0
ジプロピオニル シクロペンテノン	30	17.3	>147	2

実施例 1 4

注射剤

(1) 生理食塩液にジイソブチルシクロペンテノン、ジプロピオニルシクロ

ペンテノン又はジメトキシシクロペンテノンを1%濃度で加え、注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水にジメチルフマリルシクロペンテノン、又はジメチルマレイルシクロペンテノン及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

実施例15

錠剤

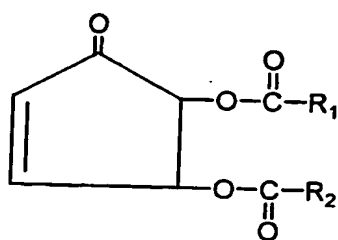
(1) ジイソブチリルシクロペンテノン又はジプロポオニルシクロペンテノンの100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、各錠剤を作製した。

(2) ジメチルフマリルシクロペンテノンの0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

以上記載したごとく、本発明により免疫調節作用、抗炎症作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用、抗真菌作用等の生理活性を有するシクロペンテノンの誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩が提供される。これらの化合物を有効成分とする医薬は、免疫調節を要する疾患、炎症抑制を要する疾患、腫瘍壊死因子産生抑制を要する疾患、病原微生物の増殖抑制を要する疾患等の治療剤、予防剤として生体の恒常性の維持に有用な医薬品である。

請求の範囲

1. 式 [I] :



[I]

(式中、 R_1 及び R_2 は同一又は異なってもよく、水素、脂肪族基、芳香族基又は芳香脂肪族基を意味する。) で表わされるシクロペンテノン誘導体若しくは光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする免疫調節を必要とする疾患、炎症抑制を必要とする疾患、腫瘍壊死因子産生抑制を必要とする疾患、真菌の抑制を要する疾患、細胞接着抑制を要する疾患、又は熱ショックタンパクの誘導を要する疾患の治療剤又は予防剤。

2. R_1 及び R_2 が同一又は異なって、水素、C1～30の直鎖又は分枝アルキル基、C2～30の直鎖又は分枝アルケニル基、C6～10のアリール基又はC1～30アルキルC6～10アリール基であり、これらは所望により、C1～30アルキル基、C1～4アルコキシ基、C2～5アルコキシカルボニル基、アミノ基、ニトロ基、オキシ基、水酸基、チオール基、硫酸基及びハロゲンから選択される1つ以上の置換基で置換されていてもよい請求項1記載の治療剤又は予防剤。

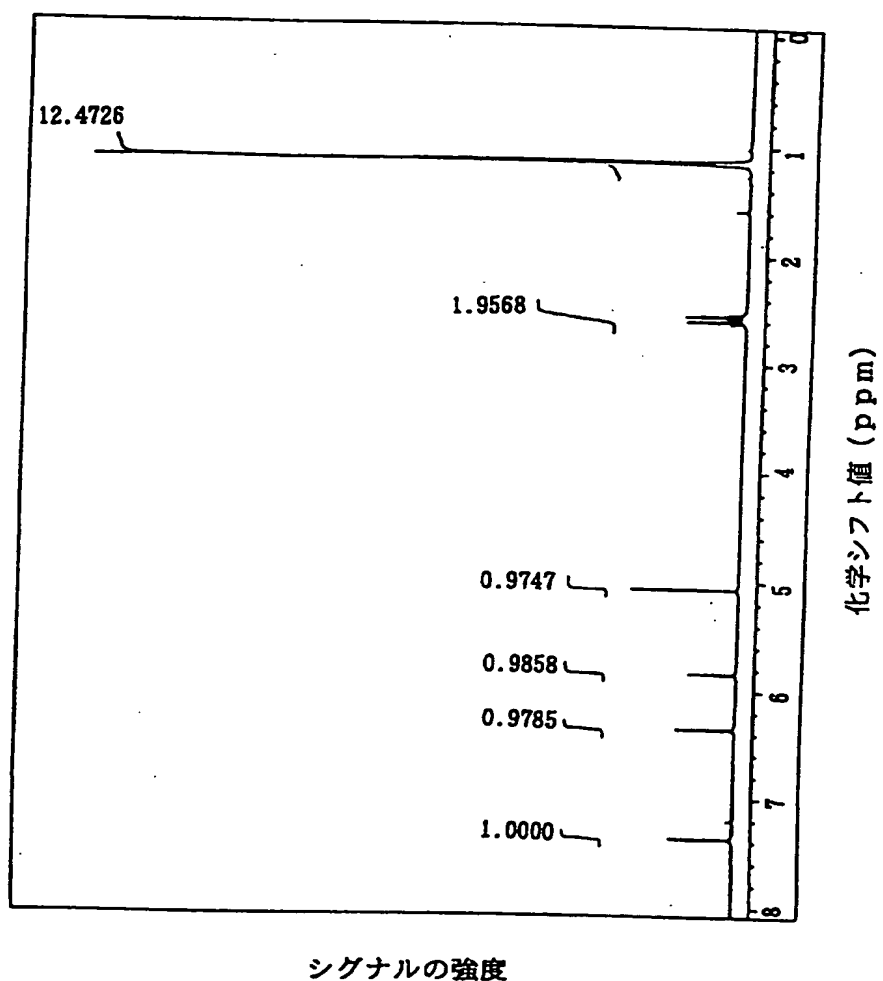
3. 式 [I] のシクロペンテノン誘導体が、ジアセチルシクロペンテノン、ジプロピオニルシクロペンテノン、ジブチリルシクロペンテノン、ジイソブチリルシクロペンテノン、ジバレリルシクロペンテノン、ジヘキサノイルシクロペンテノン、ジオクタノイルシクロペンテノン、ジデカノイルシクロペンテノン、ジミリストイルシクロペンテノン、ジメトキシアセチルシクロペンテノン、ジメチル

フマリルシクロペンテノン、ジメチルマレイルシクロペンテノン、ジ-2-ヘキセノイルシクロペンテノン、ジ-3-オクテノイルシクロペンテノン又はジベンゾイルシクロペンテノンである請求項1記載の治療剤又は予防剤。

- 5 4. 免疫調節剤、抗炎症剤、腫瘍壊死因子産生抑制剤、抗真菌剤、細胞接着抑制剤、又は熱ショックタンパク誘導剤である請求項1記載の治療剤又は予防剤。

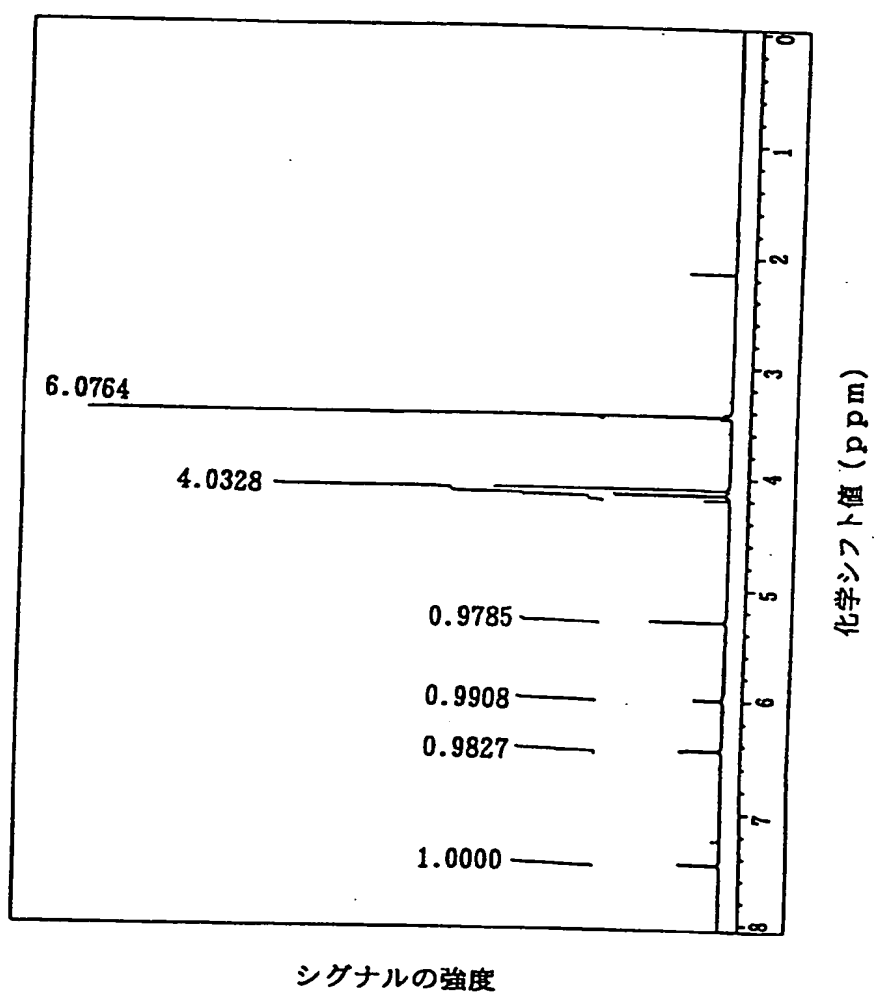
1/8

図 1



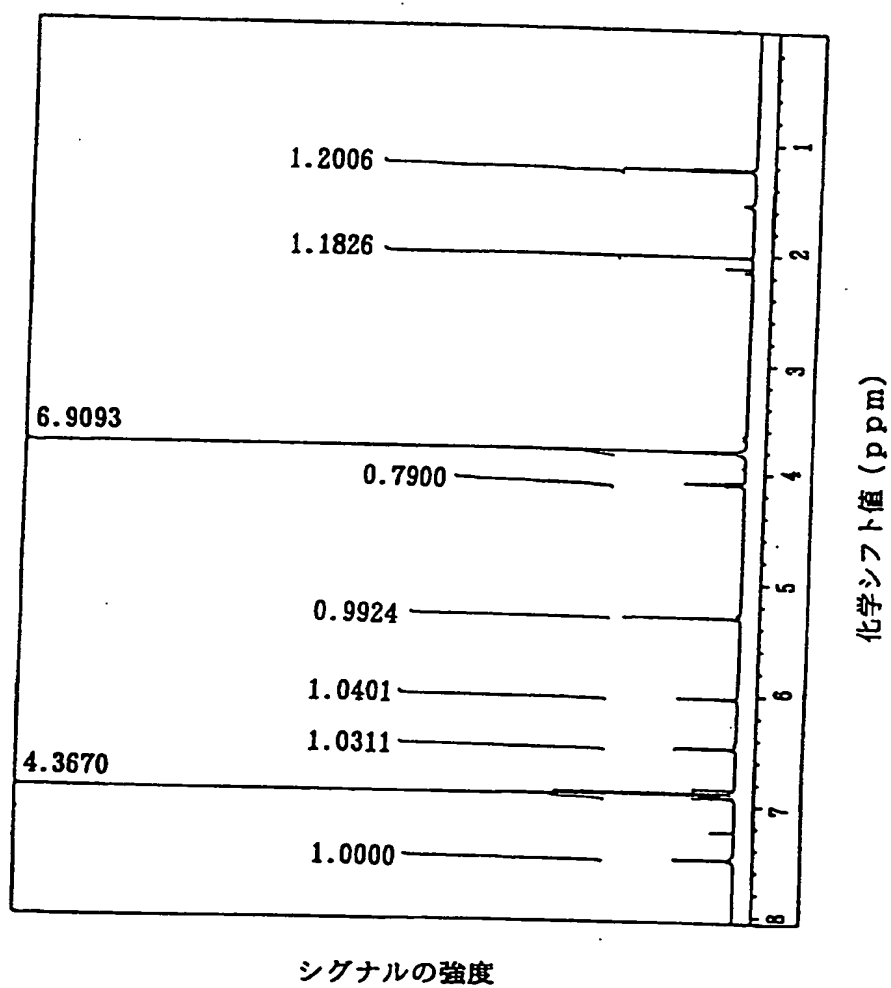
2/8

図 2



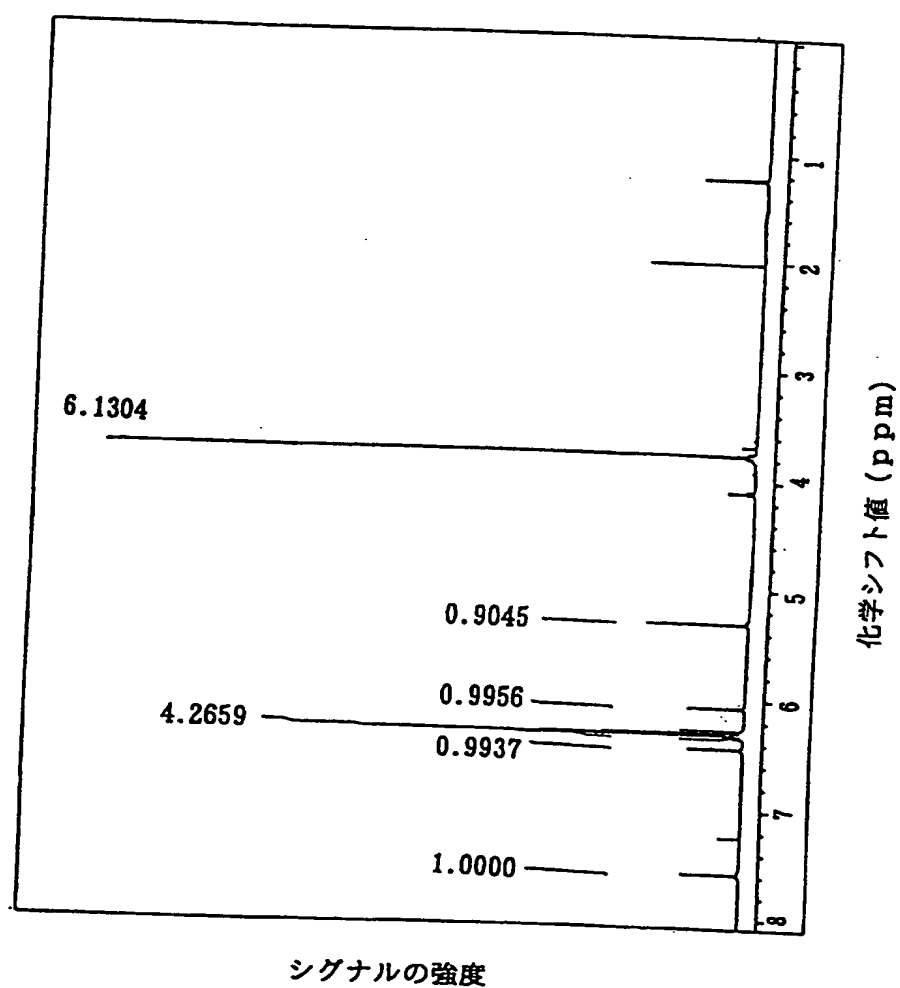
3/8

図 3



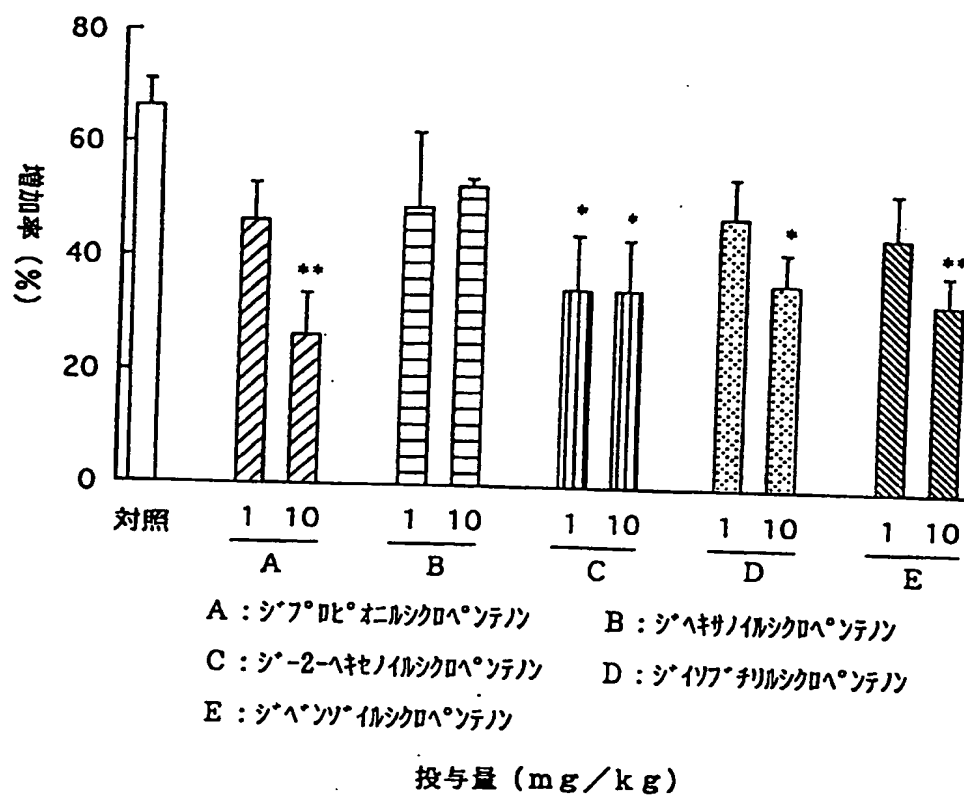
4/8

図 4



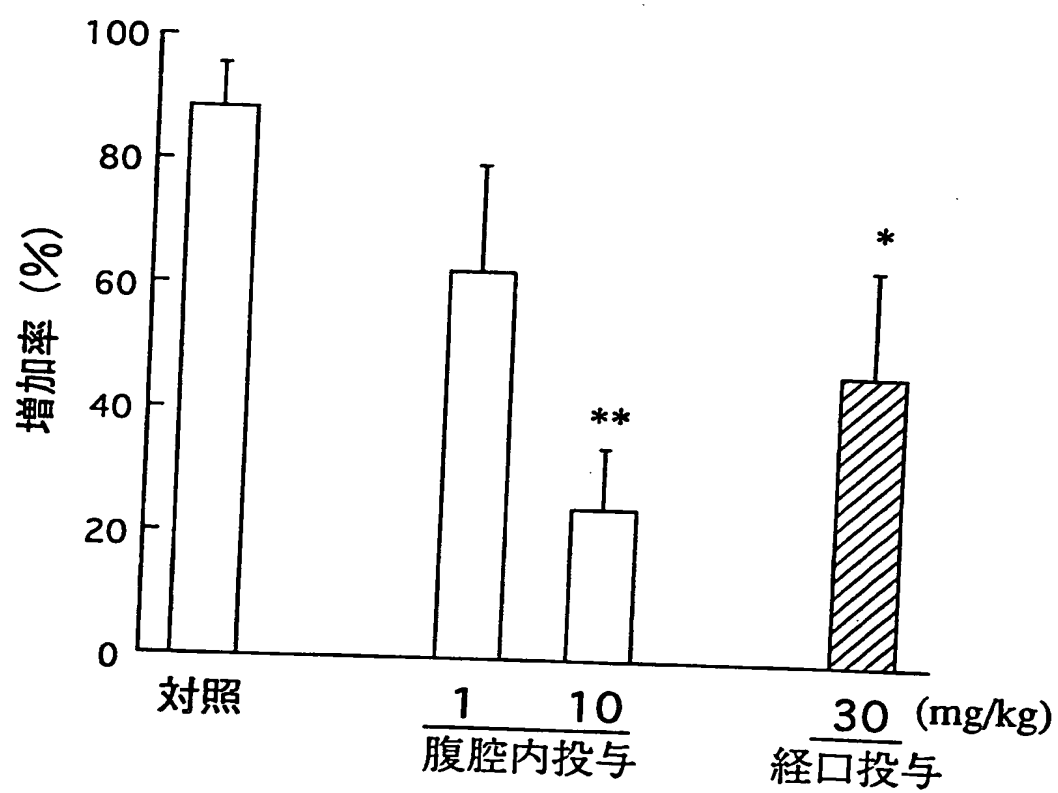
5/8

図 5



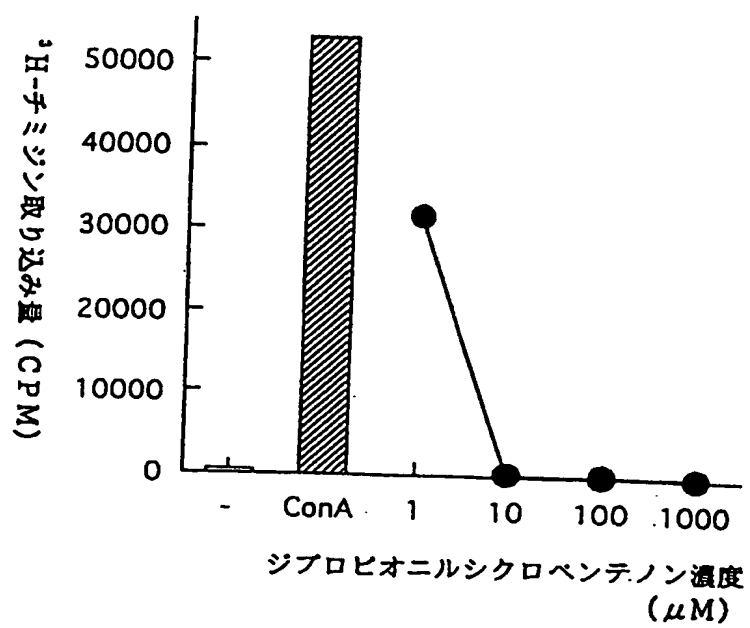
6/8

図 6



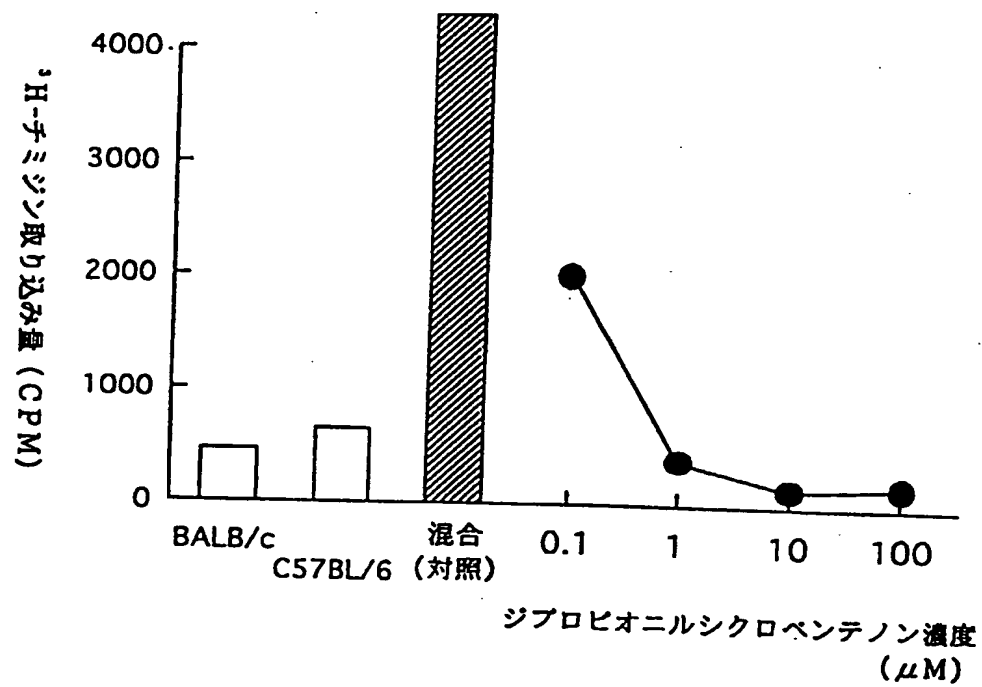
7/8

図 7



8/8

図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K31/215, A61K31/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K31/215, A61K31/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	WO, 98/40346, A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 17 September, 1998 (17. 09. 98) & AU, 9861177, A	1-4
A	JP, 2-247151, A1 (The Noguchi Institute), 2 October, 1990 (02. 10. 90) (Family: none)	1-4
A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 2 April, 1998 (02. 04. 98) & AU, 9740330, A & EP, 941981, A1	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 October, 1999 (29. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
9 November, 1999 (09. 11. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04323

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ A61K31/215, A61K31/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ A61K31/215, A61K31/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO, 98/40346, A1 (資酒造株式会社), 17. 9月. 1998 (17. 09. 98) & AU, 9861177, A	1-4
A	JP, 2-247151, A1 (財団法人野口研究所), 02. 10月. 1990 (02. 10. 90) (ファミリーなし)	1-4
A	WO, 98/13328, A1 (資酒造株式会社), 02. 4月. 1998 (02. 04. 98) & AU, 9740330, A & EP, 941981, A1	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子 印

4C

8517

電話番号 03-3581-1101 内線 3452